

**Struktur neuer Spermidinalkaloide aus
Pleurostyliia - und Maytenus - Arten**

Joseph Burghart

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0053

Struktur neuer Spermidinalkaloide aus
Pleurostyliä- und Maytenus-Arten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München


vorgelegt

von

Joseph Burghart

aus

Dachau

Mai 1979



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 18.6.1979

Meiner Mutter gewidmet
in Erinnerung

1.0	Einleitung	1
2.0	Kindheit und Jugend	2
3.0	Leben und Wirken	3
4.0	Die Mutter	4
5.0	Die Mutter	5
6.0	Die Mutter	6
7.0	Die Mutter	7
8.0	Die Mutter	8
9.0	Die Mutter	9
10.0	Die Mutter	10
11.0	Die Mutter	11
12.0	Die Mutter	12
13.0	Die Mutter	13
14.0	Die Mutter	14
15.0	Die Mutter	15
16.0	Die Mutter	16
17.0	Die Mutter	17
18.0	Die Mutter	18
19.0	Die Mutter	19
20.0	Die Mutter	20
21.0	Die Mutter	21
22.0	Die Mutter	22
23.0	Die Mutter	23
24.0	Die Mutter	24
25.0	Die Mutter	25
26.0	Die Mutter	26
27.0	Die Mutter	27
28.0	Die Mutter	28
29.0	Die Mutter	29
30.0	Die Mutter	30
31.0	Die Mutter	31
32.0	Die Mutter	32
33.0	Die Mutter	33
34.0	Die Mutter	34
35.0	Die Mutter	35
36.0	Die Mutter	36
37.0	Die Mutter	37
38.0	Die Mutter	38
39.0	Die Mutter	39
40.0	Die Mutter	40
41.0	Die Mutter	41
42.0	Die Mutter	42
43.0	Die Mutter	43
44.0	Die Mutter	44
45.0	Die Mutter	45
46.0	Die Mutter	46
47.0	Die Mutter	47
48.0	Die Mutter	48
49.0	Die Mutter	49
50.0	Die Mutter	50

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung der untersuchten Pflanzen	2
2.0 Pharmakologie	6
2.1 Verwendung von Maytenus- und Pleurostyliya-Arten in der Volksmedizin	6
2.2 Bisherige pharmakologische Untersuchungen	7
3.0 Chemie der Pflanzeninhaltsstoffe	10
3.1 Alkaloide in Celastraceen	10
3.2 Alkaloidscreening	11
4.0 Dünnschichtchromatographie und Isolierungsgang bei Maytenus heterophylla	14
4.1 DC-Untersuchung des Rohalkaloids	14
4.2 Isolierungsgang	16
5.0 Dünnschichtchromatographie und Isolierungsgang bei Pleurostyliya africana	17
5.1 Isolierung und Identifizierung der Triterpene A und B aus dem Petrolätherextrakt	17
5.2 Isolierung von Dulcit	19
5.3 DC und Isolierung der Alkaloidfraktion	21
6.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mh 1/PA-II (Celacinnin)	23
7.0 Strukturaufklärung von Alkaloid PA-III (Celallocinnin)	30
8.0 Nachweis der cis-trans-Amid-Isomerie bei Celacinnin und Celallocinin durch ¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektroskopie	33
9.0 Strukturaufklärung von Alkaloid PA-I (Pleurostylin)	49
9.1 Oxydativer Abbau von PA-I	52
9.2 ¹³ C-NMR-Untersuchung von PA-I	53
9.3 Hochfeld- ¹ H-NMR und Struktur von Pleurostylin	57
9.4 Zur Stereochemie von Pleurostylin	62
10.0 Isolierung von Alkaloiden aus Maytenus mossambicensis	64
11.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-I (Cyclocelabenzin)	70

11.1	^{13}C -NMR von Mm-I (Cyclocelabenzin)	78
11.2	Zur Stereochemie von Cyclocelabenzin	81
12.0	Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-II (Isocyclocelabenzin)	83
12.1	^{13}C -NMR von Isocyclocelabenzin (Mm-II)	93
12.2	Zur Stereochemie von Isocyclocelabenzin	100
13.0	Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-IIa (Celabenzin) .	101
14.0	Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-IV (Hydroxy-Isocyclocelabenzin)	104
15.0	Übersicht über die Spermidinalkaloide der Celastraceen-Familie	113
16.0	Zusammenfassung	115
EXPERIMENTELLER TEIL.....		117
17.0	Herkunft der Drogen	117
18.0	Herkunft von Testsubstanzen bzw. Vergleichsspektren..	117
19.0	Allgemeine Arbeitsmethoden	118
19.1	Fällungsreagentien für Alkaloide	118
19.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	119
19.21	Adsorbens	119
19.22	Laufmittel	119
19.23	Detektion	120
19.231	Alkaloide	120
19.232	Triterpene	121
19.233	Zuckeralkohole	121
19.234	Carbonsäuren	121
19.3	Präparative Dünnschichtchromatographie	121
19.4	Säulenchromatographie	122
19.5	Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC).....	123
19.6	Umkristallisieren	123
20.0	Allgemeine chemische Arbeitsmethoden	123
20.1	Acetylierungen	123
20.2	Katalytische Hydrierungen	124
21.0	Physikalisch-chemische Untersuchungen	124
22.0	Isolierungen.....	127
22.1	Isolierung on Alkaloiden aus Maytenus heterophylla..	127

22.2	Isolierung von Triterpenen aus <i>Pleurostylia africana</i> ..	129
22.21	Friedelin (Triterpen.B)	130
22.22	Epifriedelinol (Triterpen A)	131
22.23	Epifriedelinolacetat (Triterpen A - Acetat)	132
22.24	Oxydation von Epifriedelinol	132
22.3	Isolierung von Dulcit aus <i>Pleurostylia africana</i>	133
22.4	Isolierung von Alkaloiden aus <i>Pleurostylia africana</i> ..	133
22.5	Isolierung von Alkaloiden aus <i>Maytenus mossambicensis</i> .	137
22.51	Isolierung des Rohalkaloidgemisches	137
22.52	Konventionelle säulenchromatographische Auf- trennung des Rohalkaloidgemisches	138
22.53	HPLC der vorgereinigten Alkaloidfraktionen	139
22.54	Säulenchromatographische Feintrennung von Mm-IV.	141
23.0	Strukturaufklärungen	141
23.1	Celacinnin (Mh 1/PA-II)	141
23.11	Hydrierung von PA-II (Dihydrocelacinnin)	142
23.12	Acetylcelacinnin	143
23.13	Acetyl-Dihydrocelacinnin	145
23.14	UV-Isomerisierung von Celacinnin	145
23.2	Celallocinnin (Mh 2/PA-III)	146
23.21	Hydrierung von Celallocinnin	148
23.3	Pleurostylin (PA-I)	148
23.31	Acetyl-Pleurostylin (PA-I-Acetat)	150
23.32	Dihydropleurostylin (Dihydro-PA-I)	151
23.4	Cyclocelabenzin (Mm-I)	152
23.41	Acetyl-Cyclocelabenzin (Mm-I-Acetat)	153
23.5	Isocyclocelabenzin (Mm-II)	154
23.51	Acetyl-Isocyclocelabenzin (Mm-II-Acetat)	156
23.6	Celabenzin (Mm-IIa)	157
23.7	Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)	158
23.71	N-Acetyl-Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV- Acetat)	159
	LITERATURVERZEICHNIS	160

E I N L E I T U N G

Die Entdeckung der antitumorwirksamen Maytansinoide in einigen Vertretern der Celastraceen hat diese Pflanzenfamilie in den Blickpunkt der phytochemischen Forschung gerückt. Das besondere Interesse gilt dabei der Gattung Maytenus, deren Vertreter zum Teil eine breite volksmedizinische Verwendung besitzen.

Für die vorliegende Untersuchung stand aus pflanzenbotanischen Expeditionen, die in den Jahren 1974 und 1976 in Rhodesien und Südafrika durchgeführt worden waren, Blatt- bzw. Rindenmaterial von Maytenus heterophylla, Pleurostyliia africana und Maytenus mossambicensis zur Verfügung.

Ziel der Arbeit sollte sein, die in diesen Drogen bereits nachgewiesenen Alkaloide zu isolieren und strukturell aufzuklären, um damit einen Beitrag zur Chemotaxonomie der Celastraceen und eine Grundlage für künftige pharmakologische Prüfungen zu liefern.

A L L G E M E I N E R T E I L

1.0 Vorkommen und botanische Beschreibung der untersuchten

Pflanzen

Maytenus heterophylla (Eckl. und Zeyh.) N. Robson subsp. heterophylla

Die Gattung Maytenus ist nach ihrer Zusammenlegung mit Gymnosporia mit über 200 Arten die größte innerhalb der Celastraceen (1,2). Der Name Maytenus kommt von der chilenischen Bezeichnung "Mayten" für die dort vorkommende Maytenus boaria Molina. Die systematische Abgrenzung einiger Maytenus-Arten ist ausgesprochen schwierig. Insbesondere die vom Sudan südwärts bis Südafrika und nach Westen bis Angola häufig vorkommende Maytenus heterophylla (Eckl. u. Zeyh.) N. Robson (s. Abb. 1) ist ausgesprochen formenreich. So führt ROBSON in der Flora Zambesiaca über 40 Synonyma an und unterteilt in 4 Unterarten (3).

Unsere Untersuchungen befaßten sich mit einer Droge aus dem District Salisbury (Rhodesien), die von T. MÜLLER (Coll. No. 2193) vom Herbario Rhodesiensi als Maytenus heterophylla (Eckl. u. Zeyh.) Robson subsp. heterophylla identifiziert worden war.

Sie kommt vor als kahler Strauch oder Baum von 1-7 m Höhe an Waldrändern oder in Buschgebieten. Junge Zweige sind grün bis braun und werden später dunkelgrau bis purpurbraun mit glatter oder leicht furchiger Rinde. Die graugrünen Blätter variieren in Gestalt und Aussehen und haben hervortretende Nervatur. Die diözischen, etwa 2-5 mm großen, weiblichen Blüten besitzen einen unangenehmen Geruch nach verfaultem Fleisch und sitzen in dichasial verzweigten Blütenständen, meist in den Achseln von Kurztrieben. Die weiblichen Blüten sind kleiner als die männlichen Blüten und haben Staminoidien, die kürzer sind als die Fruchtknoten. Die 5 Kronblätter sind bei Subspecies heterophylla länger als die 5 Staubblätter und der 2-3 narbige Griffel. Die ledrige, gelb bis rötliche Kapsel enthält 1-3 Samen, die etwa zur Hälfte von einem dünnen, gelblichen Arillus bedeckt sind (2,3).



Abb. 1

Maytenus heterophylla

Nach Flora Zambesiaca (3): a) Zweig mit männl. Blüten ($\times 1/3$);
 b) männl. Blüte ($\times 3$); c) weibl. Blüte ($\times 3$); d) Fruchtkapsel
 ($\times 1$); e) Same mit Arillus ($\times 1/2$)

Pleurostylia africana Loes.

Es sind etwa 6 *Pleurostylia*-Arten (Unterfamilie: Cassinoideae) beschrieben, die alle in den tropischen und subtropischen Gebieten der Alten Welt beheimatet sind. Die von uns untersuchte *Pleurostylia africana* Loes. (s. Abb. 2) stammt aus Rhodesien, kommt aber auch in Kenya, Uganda, Tansania und Angola vor. Sie unterscheidet sich von der in Südafrika beheimateten, nahe verwandten *P. capensis* durch die Zahl der Samenanlagen (2-3 bei *P. africana*, 6-8 bei *P. capensis*) in jeder Fruchtknotenkammer (2,3). *P. africana* wächst bevorzugt auf felsigem Hügelgelände und Waldrändern auf trockenen Böden in Höhen von 400-1100 m und bildet 1-16 m hohe Sträucher oder Bäume mit abgerundeter Krone. Junge Zweige sind graugrün und werden mit zunehmendem Alter weinrot. Die ledrigen, länglich-elliptischen Blätter sind auf der Oberseite hell- bis dunkelgrün glänzend, auf der Unterseite blasser und lassen auf beiden Seiten eine hervorgehobene Netznervatur erkennen. 3-15 zweigeschlechtliche Einzelblütchen sitzen in einem dicht gedrängtem Büschel in den Blattachseln. Die Kronblätter sind bis 1 mm lang, breit oval bis halbkreisförmig mit durchgehendem glattem Rand; die Kelchblätter 1-2 mm lang, länglich mit fein gezähntem Rand. Der Fruchtknoten ist eiförmig und leicht asymmetrisch. Die grünen 7-8 mm langen, eiförmig bis elliptischen Früchte enthalten einen plankonvexen Samen ohne Arillus (1,3).

Maytenus mossambicensis (Klotzsch) Blakelock var. *mossambicensis*

Maytenus mossambicensis ist ebenfalls eine formenreiche Art (2,3). Sie besitzt den Habitus eines 1-8 m hohen Busches. Als Unterholz von Wäldern bildet sie oft ein undurchdringliches Gestrüpp. Die Sprosse tragen bis zu 8 cm lange Dornen. Unsere aus Rhodesien stammende Varietät (var. *mossambicensis*) kommt auch in Kenya, Tansania bis Natal und Transvaal in Höhen von 150-1950 m vor und hat weiße Blüten, während in Südafrika noch eine Varietät mit haarigen, rosa bis roten Blüten (var. *rubra*) existiert.

Die 1-7 cm langen und 1-4 cm breiten, ovalen bis elliptischen Blätter sind an der Oberseite hellgrün, an der Unterseite etwas blasser mit unregelmäßig gekerbtem Rand. Die seitlichen Nerven



Abb. 2

Pleurostylia africana

Nach Flora Zambesiaca (3): a) blühender Zweig (x 1/3); b) Blüte (x 5); c) senkrechter Schnitt durch die Blüte (x 5); d) Fruchtknoten (Querschnitt, x 6); e) Frucht (x 3.5); f) Same (x 3); g) Same (Querschnitt, x 3)

und die schwache Netznervatur treten an der Unterseite etwas stärker hervor. 3-55 zweigeschlechtliche Blüten mit 2-5 mm Durchmesser bilden einen zymösen Blütenstand in den Achseln von Kurztrieben. 5 ungleiche Kronblätter, 0,4-1 mm lang, dreieckig bis halbkreisförmig, kahl oder an der Außenseite schwach behaart, sowie 5 weiße, 1,5-2,7 mm lange, elliptisch bis längliche Kelchblätter. Die 5 schlanken Staubblätter mit 0,7-1 mm langen Filamenten sitzen unterhalb des gelblichen, fünflappigen Diskus. Der dreifächerige Fruchtknoten ist zu $1/4$ in den Diskus eingesenkt und hat einen sehr kurzen Griffel mit 3 großen auseinanderstrebenden Narben. Die 7-13 mm große, glatte, ledrig bis leicht fleischige Kapsel ist im unreifen Zustand weiß, wird während der Reife rosa bis rot und enthält 3 rotbraune Samen, die völlig von einem kräftig orangem Arillus umgeben sind.

2.0 Pharmakologie

2.1 Verwendung von Maytenus- und Pleurostyliya-Arten in der

Volksmedizin

Maytenus heterophylla hat in der Medizin der Volksstämme im südlichen Teil Afrikas eine weite Verbreitung. Die Rinde gilt als Heilmittel bei Ruhr (Dysenterie), während die Wurzeln und Dornen bei Husten und Erkältungskrankheiten, eine Abkochung der gesamten Pflanze dagegen als Heilmittel gegen Schlangenbiß verwendet werden. Eine Einreibung dient als Aphrodisiacum (2). Eine Abkochung der Wurzeln soll eine anthelmintische Wirkung besitzen. Außerdem wird über gute Erfolge bei der Behandlung von Hernien und Syphilis berichtet (6).

Da die formenreiche, weit verbreitete Maytenus heterophylla taxonomisch schwierig von anderen Maytenus-Arten abzugrenzen ist (3,4), interessiert auch die volksmedizinische Anwendung nahe verwandter Arten wie z.B. Maytenus senegalensis (Lam.) Exell. Eine Wurzelabkochung der botanisch mit M. senegalensis synonymen M. buxifolia (L.) Szysz. wird als Mittel gegen Epilepsie und eitrig verhärtete Abszesse empfohlen (4). Die

Zulus verwenden einen Aufguß der Rinde zur Bekämpfung von Diarrhoeen bei Mensch und Tier (5).

Über eine volksmedizinische Verwendung von *Pleurostylia africana* war in der Literatur nichts zu finden.

Der Saft der Blätter und eine Wurzelabkochung von *Maytenus mossambicensis* (Klotzsch) Blakelock var. *mossambicensis* soll auch gegen Malaria wirksam sein (4).

2.2 Bisherige pharmakologische Untersuchungen

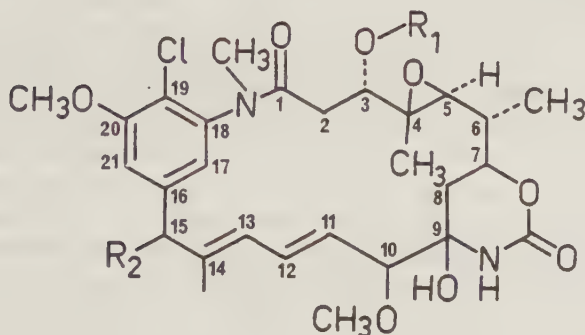
Bisher sind keine isolierten Verbindungen aus den drei untersuchten Drogen pharmakologisch getestet worden. Für Extrakte aus den Blättern von *Maytenus laevis* (Venezuela) wurde eine Steigerung der Phagocytoseaktivität des reticulo-endothelialen Systems (7) und eine Strahlenschutzwirkung (8) festgestellt.

Die mit *Maytenus heterophylla* eng verwandte *Maytenus senegalensis* wurde von mehreren Arbeitskreisen untersucht (9,10, 11,12). Dabei zeigte vor allem die Chloroformfraktion eine reproduzierbare Aktivität gegenüber 99 KB Nasopharynx-Carcinom sowie gegen L-1210 und PS-Leukämie-Tumore bei Mäusen. Von den isolierten Einzelsubstanzen (β -Amyrin, Dulcit, Wilfordin, β -Sitosterol und Triterpen A = Maytenonsäure) besaß lediglich Dulcit eine sehr geringe Aktivität gegen PS-Leukämie, aber keine Cytoxicität (10). Der sechswertige Zuckeralkohol Dulcit ist familientypisch für zahlreiche Celastraceen (13,14). Er konnte auch von uns in den Blättern von *Pleurostylia africana* nachgewiesen werden. Das eigentliche antitumorale Wirkprinzip von *M. senegalensis* stellen die Maytansinoide dar (15). Das gleiche gilt für *M. mossambicensis*, während Extrakte von *Pleurostylia africana* (11 Proben getestet) keine antitumorale Aktivität zeigten (15). Für eine nicht näher botanisch klassifizierte *M. heterophylla* konnte ebenfalls eine antileukämische Aktivität bestätigt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Wirkprinzip um Maytansinoide.

Maytansin war der erste Vertreter einer Reihe von antileukämischen Ansamacroliden, die von KUPCHAN und Mitarbeitern zunächst aus *Maytenus ovatus* Loes (16) (inzwischen *M. serrata* (Hochst., ex A. Rich.) R. Wilczek), später aus einer Reihe weiterer afrikanischer Celastraceen, nämlich *M. buchananii* und *Putterlickia verrucosa* isoliert wurden (17,18,19,20,21). Die strukturelle Verwandtschaft mit verschiedenen Ansamacrolid-Antibiotica, wie Rifamycin S und Geldanamycin, sowie das Vorkommen in äußerst geringer Konzentration ließen vermuten, daß es sich bei den Maytansinoiden um Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen handelt. Diese Vermutung schien durch die Isolierung von antileukämischen Ansamacroliden aus verschiedenen Pflanzen in verschiedenen Ländern, z.B. der texanischen Rhamnaceen-Art *Colubrina texensis* Gray, zunächst widerlegt (22). Inzwischen ist es aber japanischen Wissenschaftlern gelungen, eine als Ansamitocin bezeichnete Gruppe von Maytansinoiden aus Mikroorganismen (Proactinomyceten des Genus Nocardia) zu erhalten (23), so daß die frühere Vermutung wieder einige Wahrscheinlichkeit besitzt.

Maytansin hat eine Reihe pharmakologischer und toxikologischer Tests durchlaufen und wird derzeit in den USA klinisch erprobt. Es verhindert ähnlich wie Vincristin die Mitose in der Metaphase (24). Es ist gegen verschiedene Tumore einschließlich P 388-Leukämie, B 16-Melanom und dem Lewis-Lungencarcinom in vivo wirksam (25). Für auf Vincristin empfindliche P 388-Tumoren genügte zum Erreichen der Vincristin-Wirkung etwa 1/10 der Maytansindosis, während auf Vincristin resistente Linien des P 388-Tumors mit Maytansin ebenfalls keine Wirkung (Kreuzresistenz) zu erzielen war (26). Inzwischen befindet sich Maytansin in den USA in der zweiten Phase der klinischen Prüfungen, nachdem es die erste Phase erfolgreich überstanden hat (27). Die großen Bemühungen zur Synthese von Maytansin haben in der Totalsynthese von $(\pm)$ -N-Methylmaysenin durch COREY zu einem ersten Teilerfolg geführt (28). Trotzdem werden weitere Bemühungen gemacht, um neue natürliche Vorkommen aufzufinden.

ANTILEUKÄMISCH WIRKSAME MAYTANSINOIDE



R ₁	R ₂	NAME	VORKOMMEN und GEHALT in %	Lit.
Ac	H	MAYTANACIN =ANSAMITOCIN P-1	<i>Putterlickia verrucosa</i> 3.6x10 ⁻⁶ <i>Nocardia</i> (Proactinomyc.)	(20) (23)
COOCHMe MeNCOEt	H	MAYTANSIN	<i>Mayt.serrata</i> 2.1x10 ⁻⁵ <i>Mayt.buchananii</i> 1.5x10 ⁻⁴ <i>Putt.verrucosa</i> 1.2x10 ⁻³ !	(16) (18) (20)
COCHMe MeNCOEt	H	MAYTANPRIN	<i>M.buchananii</i> 1.2x10 ⁻⁴ <i>P.verrucosa</i> 8.5x10 ⁻⁴	(17) (20)
COCHMe MeNCOCHMe Et	H	MAYTANBUTIN	<i>M.buchananii</i> 9.0x10 ⁻⁵ <i>P.verrucosa</i> 4.5x10 ⁻⁴	(17) (20)
COCHMe MeNCOCH ₂ CH ₂ Me ₂	H	MAYTANVALIN	<i>M.buchananii</i> 3.5x10 ⁻⁶	(19)
COCHMe ₂	OCOMe	MAYTANBUTACIN	<i>M.serrata</i> 1.1x10 ⁻⁵	(21)
COCHMe MeNCOCHMe ₂	OH	COLUBRINOL	<i>Colubrina texensis</i> 3.0x10 ⁻⁵ (<i>Rhamnaceae</i>)	(22)
COCHMe MeNCOCHMe ₂	OCOMe	COLUBRINOL- ACETAT	<i>Colubrina texensis</i> 5.0x10 ⁻⁵ (<i>Rhamnaceae</i>)	(22)
COEt	H	ANSAMITOCIN P-2	<i>Nocardia</i> (Proactinomyc.)	(23)
COCHMe ₂	H	ANSAMITOCIN P-3	<i>Nocardia</i>	(23)
COCH ₂ Et	H	ANSAMITOCIN P-3'	<i>Nocardia</i>	(23)
COCH ₂ CHMe ₂	H	ANSAMITOCIN P-4	<i>Nocardia</i>	(23)

3.0 Chemie der Pflanzeninhaltsstoffe der untersuchten Maytenus- und Pleurostyliya-Arten

Die drei von uns bearbeiteten Pflanzen waren bisher praktisch nicht phytochemisch untersucht worden (13). Von F. HAERDI wird nur berichtet, daß *M. buxifolia* (L.) Szysz. (= *M. heterophylla* (3)) und *M. mossambicensis* einen positiven Test mit Mayer's Alkaloidreagens (4) liefert. Außerdem sollen in der Rinde von *Gymnosporia buxifolia* Szysz. (= *M. heterophylla* (3)) Tannine nachgewiesen worden sein (5). Nach RÖMHILD enthält die Wurzel von *M. heterophylla* keine Amine (29).

Im Verlauf der Arbeiten erhielten wir durch das National Cancer Institute (15) Mitteilung über bereits durchgeführte Antitumorteste bei Extrakten uns interessierender Celastraceenarten. *M. mossambicensis* enthält demnach Maytansinoide, jedoch im Vergleich zu einigen anderen Maytenus-Arten nur in noch geringeren Konzentrationen.

3.1 Alkaloide in Celastraceen

Alkaloidtyp	Hauptsächliches Vorkommen in den Pflanzengattungen:	Lit.
Sesquiterpen-Esteralkaloide	Euonymus, Catha, Celastrus, Tripterygium, Maytenus, Cassine	(30,31, 32,33, 34)
Tetrahydrochinolin-alkaloide und Pyrrolizidinalkaloide	Bhesa (= Kurrimia)	(35)
Tetrahydroisochinolin-alkaloide und Peptidalkaloide	Euonymus	(36)
Coffein und Xanthin-alkaloide	Maytenus	(37,38)
Phenylalkylamine	Catha	(39)
Spermidinalkaloide	Tripterygium, Maytenus, Peripterygia	(40,41, 42,43)

T a b e l l e 1

Weit verbreitet und als familiärentypisch anzusehen sind vor allem die schwach basischen Sesquiterpenesteralkaloide. Das Vorkommen von Coffein und Xanthinalkaloiden ist umstritten (44). Einen Überblick über die verschiedenen bisher aufgefundenen Alkaloidtypen in der Celastraceenfamilie bis einschließlich 1977 gibt eine Übersichtsarbeit von BRÜNING und WAGNER (13).

3.2 Alkaloidscreening

Der Alkaloidnachweis wird im allgemeinen in salzsaurer Lösung durch Fällungsreagentien unter Bildung komplexer Schwermetallsalze geführt. Falsch-positive Reaktionen sind nach FARNSWORTH, der sich intensiv mit den Methoden und Problemen des Alkaloidscreenings beschäftigt hat, vor allem auf die Anwesenheit von Proteinen zurückzuführen (45,46). Häufig genügt Aussalzen mit Natriumchlorid, um diese Störung zu beseitigen. Der dünnschichtchromatographische Nachweis wird mit Dragendorff- oder Jodplatinat-Reagens geführt (47,48). Doch werden öfters Dragendorff-positive Reaktionen von stickstofffreien Verbindungen berichtet (49,50)*. Als minimales Strukturkriterium wurde von FARNSWORTH die Anwesenheit einer konjugierten Carbonyl- oder Lactongruppe angesehen, doch geben manche Steroide und Triterpene, die diesen Anforderungen nicht genügen, ebenfalls eine positive Dragendorff-Reaktion, insbesondere wenn durch Nachbesprühen mit 10% NaNO_2 -Lösung eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 10 erreicht wird (51). Derartige Faktoren gilt es bei der Beurteilung eines Alkaloidscreenings zu bedenken.

Zur Untersuchung auf Alkaloide verwendeten wir ein aus dem Arbeitskreis BEAL (52) stammendes Verfahren, das von uns in einigen Punkten abgeändert worden war.

20 g Droge werden mit 150 ml Äthanol zwei Stunden unter Rückfluß extrahiert. Nach Abkühlen wird filtriert und zur Trockne eingedunstet. Den Rückstand verteilt man unter Rühren zwischen 50 ml 10% Na_2CO_3 -Lösung und 50 ml Chloroform. Die wäßrige alkalische Phase wird noch zweimal mit 25 ml Chloroform ausgeschüttelt, dann mit Mayers und Valsers Reagens auf quartäre

* Dissertation R. Seitz (Universität München 1979)

Ammoniumbasen getestet. Die vereinigten Chloroformphasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und auf ca. 3-4 ml eingeengt. Daraus erfolgt mit Mengen von ca. 30 μ l dünnschichtchromatographische Testung mit dem Dragendorff-Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (44) und Nachbesprühen mit 10% Natriumnitrit-Lösung. Außerdem werden die Chloroformphasen in einem Zentrifugenglas mehrmals gegen 1-2 ml 5% HCl verteilt bis ein Volumen von 5 ml HCl-Phase erreicht ist. Davon werden je 2 ml mit je 3 Tropfen Mayers und Valsers Reagens versetzt und mit einer in gleicher Weise behandelten Vergleichslösung von 1 mg Brucin in 2 ml 2% HCl verglichen.

Das Ergebnis des mit 11 Celastraceen-Arten durchgeführten Screenings ist in der Tabelle 2 zusammengestellt. Wie hieraus hervorgeht, enthalten die Blatt- bzw. Rindenproben von *Maytenus mossambicensis* den höchsten Alkaloidgehalt.

Erläuterungen zur Tabelle 2 S.13 :

- : negative Reaktion
- (+), (-) : nicht eindeutig positive oder negative Reaktion
- + : positive Reaktion, nicht stärker als bei Vergleichslösung
- ++ : stark positive Reaktion, stärker als bei Vergleichslösung

T a b e l l e 2

Ergebnisse des Alkaloid-Screenings verschiedener Celastraceen-Arten

Untersuchte Art	Teil der Pflanze	Herkunft	Tertiäre* Alkaloide			
			aus HCl-Ph./ May. Vals. Drag.		nach DC: +10% NaNO ₂	
Eleaodendron (Cassine) buchananii Loes.	Blätter Stammrinde Wurzelrinde	Kenya, 2/77	- (-) +	- (-) +	(+) + +	+ + +
Hippocratea indica	Zweige	Rhodesien 3/76	+	+	+	+
MAYTENUS acuminata (L.f.) Loes	Blätter Rinde	Südafrika 4/76	- -	- -	- (+)	- (+)
M. boaria Molina	Blätter Rinde Wurzelholz Wurzelrinde	Chile (Caelo)	- - (+) +	(-) (-) (-) +	- (+) + +	(+) (+) + +
<u>M.heterophylla (Eckl., Zeyh.) N.Robson</u>	Blätter Stammrinde	Rhodesien 3/76	(-) -?!	(+) -?!	(+)	+
subsp.heterophylla	Blätter Rinde	Rhodesien 8/74	- +	- +	+	+
M.ilicifolia Mart.et. Reiss	Blätter Wurzel	Brasilien (Caelo)	- (+)	(+) +	(+) +	+
<u>M.mossambicensis (Klotzsch) Blakelock</u>	Blätter Zweige Wurzelrinde	Rhodesien 3/76	++ ++ +	++ ++ +	++ ++ +	++ ++ +
M.pubescens N.K.B. Robson	Stammrinde Wurzel	Rhodesien 3/76	- -	- -	- +	+
M.undata (Thunb.) Blakelock	Blätter	Rhodesien 3/76	-	-	-	-
<u>Pleurostylia africana Loes.</u>	Blätter Blätter Stammrinde Wurzel	Rhodesien 8/74 Rhodesien 3/76	++ ++ +	++ ++ +	++ ++ +	++ ++ +
Pterocelastrus tricuspidatus (Lam.) Sond	Blätter Rinde	Südafrika 4/76	- -	- -	- (+)	- +

* Keine der untersuchten Drogen ergab einen Hinweis auf quartäre Ammoniumbasen

4.0 Dünnschichtchromatographie und Isolierungsgang bei Maytenus heterophylla

4.1 DC-Untersuchung des Rohalkaloids

Die DC des Rohalkaloidgemisches aus dem vorangegangenen Alkaloidscreening sprach dafür, daß relativ polare und stärker basische Verbindungen als die für Celastraceen typischen Esteralkaloide vorlagen. Die Detektion mit Dragendorff-Reagens ergab das Vorliegen eines Hauptalkaloides (Mh 1) und eines Nebenalkaloides (Mh 2). Vor allem im oberen Rf-Bereich waren noch einige hellblau und gelblich fluoreszierende Flecke nachweisbar, die keine Dragendorff-positive Reaktion zeigten.

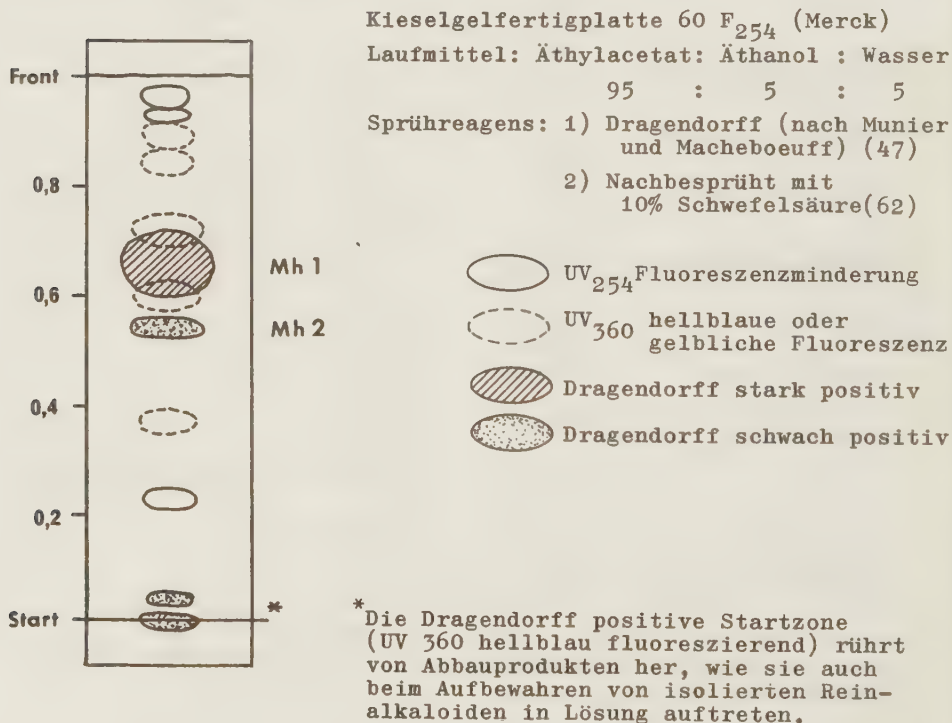


Abb. 4

Dünnschichtchromatogramm des Rohalkaloids aus der Rinde von *Maytenus heterophylla*.

Isolierungsgang bei Maytenus heterophylla

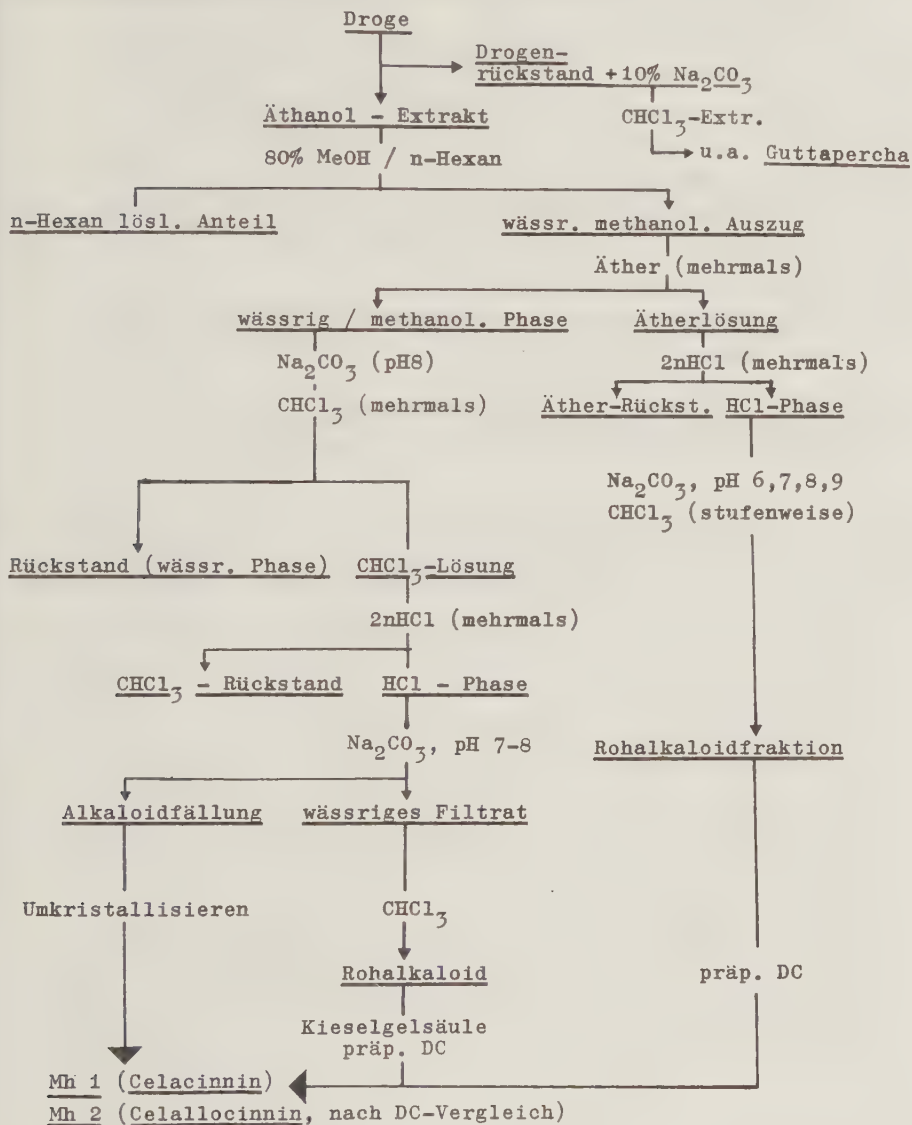


Abb. 5

4.2 Isolierung der Alkaloide von *Maytenus heterophylla*

Die Droge wurde nach dem in Abb. 5 gezeigtem Isolierungsgang aufgearbeitet. Der nicht in Äthanol lösliche Drogenrückstand wurde mit 10% Na_2CO_3 -Lösung durchfeuchtet und mit CHCl_3 nachextrahiert. Beim Einrotieren des CHCl_3 -Extraktes blieb ein Rückstand von Guttapercha, das für die Celastraceen-Familie charakteristisch ist (14). Alkaloide waren in dem CHCl_3 -Extrakt nur in Spuren vorhanden. In der DC konnten keine anderen, evtl. schwächer basischen Verbindungen nachgewiesen werden.

Der äthanolische Extrakt wurde zur Trockne eingeeengt, und zwischen 80% Methanol und n-Hexan verteilt, um lipophile Substanzen abzutrennen. Anschließend wurde der wäßrige Anteil nach Entfernen des Methanols gegen Äther verteilt. Die wäßrige Phase brachten wir mit Na_2CO_3 auf pH 8 und extrahierten ein zweites Mal, diesmal mit Chloroform. Chloroform- und Ätherphasen wurden getrennt durch Säure-Base-Verteilung weiter gereinigt. Bei der Neutralisation der salzsauren Phasen fiel eine weiße Alkaloidfällung an, die durch mehrfaches Umkristallisieren direkt das Hauptalkaloid Mh 1 lieferte. Weitere Mengen an Mh 1 konnten aus dem wäßrigen Filtrat und der Ätherlösung nach säulen- und dünnschichtchromatographischer Reinigung an Kieselgel erhalten werden.

Mh 2 war auf diesem Wege nicht in genügender Menge und Reinheit zu erhalten. Mh 2 konnte später ebenso wie Mh 1 aus Pleurostylia africana, das in größerer Menge zur Verfügung stand, in guten Ausbeuten erhalten werden. Nachdem eindeutig feststand, daß Mh 1 und Mh 2 aus *Maytenus heterophylla* mit den Alkaloiden PA-II und PA-III aus *Pleurostylia africana* identisch waren, wurden die Reinalkaloide bei späteren Untersuchungen nicht mehr nach ihrer jeweiligen pflanzlichen Herkunft unterschieden.

5.0 Dünnschichtchromatographie und Isolierungsgang bei

Pleurostylia africana

Die Extraktion der Blätter von *Pleurostylia africana* erfolgte ohne Alkalisierung nacheinander mit Petroläther, Äther und Äthanol. Nach dem Dünnschichtchromatogramm waren im Petrolätherextrakt Triterpenverbindungen, aber keine Alkaloide nachweisbar. Im Ätherextrakt waren Alkaloide schwach und im Äthanolextrakt deutlich nachzuweisen. Ein Vorversuch mit Drogenmaterial, das mit 10% Na_2CO_3 -Lösung alkalisiert worden war, brachte das gleiche Ergebnis. Es konnten dabei keine weiteren, weniger polare Alkaloide gefunden werden. Nur die Anreicherung der Alkaloidbasen im Ätherextrakt war etwas erhöht.

5.1 Isolierung und Identifizierung der Triterpene A und B aus dem

Petrolätherextrakt

Aus dem Petrolätherextrakt fiel beim Stehenlassen ein gelblicher kristalliner Rückstand an. Durch Umkristallisieren konnte daraus ein weißes Rohkristallisat erhalten werden. Die DC-Untersuchung (s. Abb. 6 S. 18) ergab zwei Hauptflecken, Triterpen A und Triterpen B. Sie konnten mit Chloroform an einer Kieselgelsäule aufgetrennt und kristallin erhalten werden.

Triterpen A: $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$, Smp. 285 - 287°C (Plättchen).

Triterpen B: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, Smp. 262 - 264°C (Nadeln).

Bei beiden Verbindungen mußte es sich auf Grund ihrer Farbreaktion und der Summenformeln (C_{30} -Körper) um pentacyclische Triterpene handeln (53,54). Triterpen A und B sind gesättigte Verbindungen, die keine olefinischen Protonen im ^1H -NMR aufweisen. Die Verbindung A zeigt im IR-Spektrum eine OH-Valenzschwingung (3620 und 3480 cm^{-1}), Verbindung B dagegen eine Carbonylbande (1710 cm^{-1}). Dieses zusätzliche Doppelbindungsäquivalent erklärt die Differenz von zwei Wasserstoffatomen im Massenspektrum (A: $\text{M}^+ = 428$; B: $\text{M}^+ = 426$). Die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Triterpen B deuteten auf eine Identität mit Friedelin hin. Den Beweis brachten der DC-, IR- und MS-Vergleich mit authentischem Friedelin.

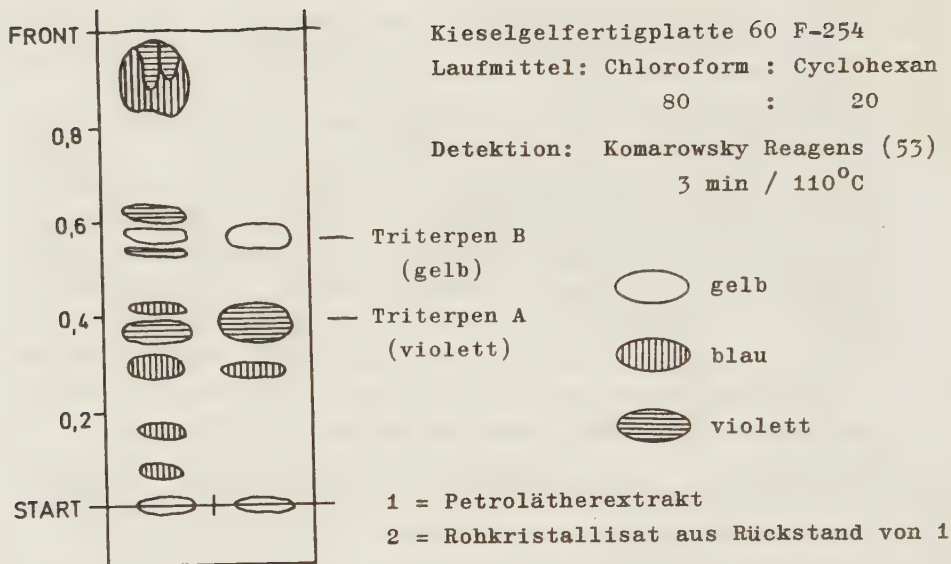
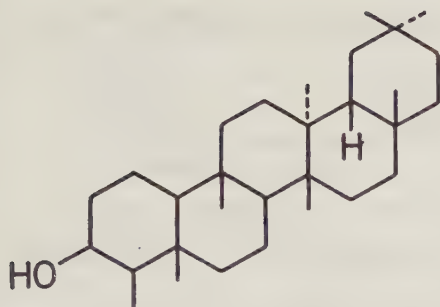


Abb. 6

Dünnschichtchromatographie des Terpengemisches aus *Pleurostyliia africana*

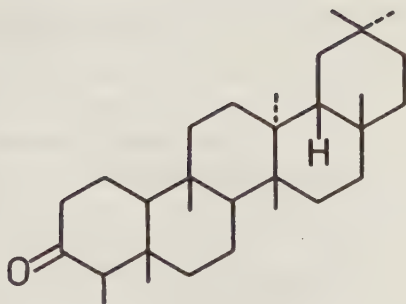
Triterpen A ließ sich durch CrO_3 -Oxidation in Triterpen B (Friedelin) umwandeln (55). Als mögliche Struktur kam daher nur Friedelan-3 α -ol oder Friedelan-3 β -ol (Epifriedelinol) in Frage. Ein Vergleich der physikalisch-chemischen Daten von Triterpen A und seinem Acetylderivat mit denen der Literatur ergab eindeutig Epifriedelinol (56,57). Friedelin und Epifriedelinol (s. S. 7) sind bereits mehrmals in Celastraceen nachgewiesen worden (13).

1976 gelang die Totalsynthese von(±)-Friedelin (58). Eine Röntgenstruktur- und Konformationsuntersuchung von Epifriedelinol wurde 1977 von einem südafrikanischem Arbeitskreis veröffentlicht(59).



A: $C_{30}H_{52}O$

Epifriedelinol



B: $C_{30}H_{50}O$

Friedelin

Abb. 7

Struktur von Triterpen A (Epifriedelinol) und Triterpen B (Friedelin) aus *Pleurostylia africana*.

5.2 Isolierung von Dulcit

Beim Stehenlassen des eingeeengten Äthanolextraktes war ein bräunlicher Rückstand angefallen. Ein Alkaloidnachweis verlief negativ. Mehrfaches Umkristallisieren aus einer Mischung von heißem Wasser und Methanol ergab weiße Kristalle vom Schmelzpunkt $188-189^{\circ}\text{C}$. Durch DC-Vergleiche, Mischschmelzpunkt (ohne Depression) und IR-Spektrum konnte die Verbindung eindeutig als Dulcit (Galactitol) identifiziert werden. Dieser Zuckeralkohol kommt nach den Arbeiten von PLOUVIER allgemein in Celastraceen vor (60).

Isolierungsgang bei Pleurostylia africana

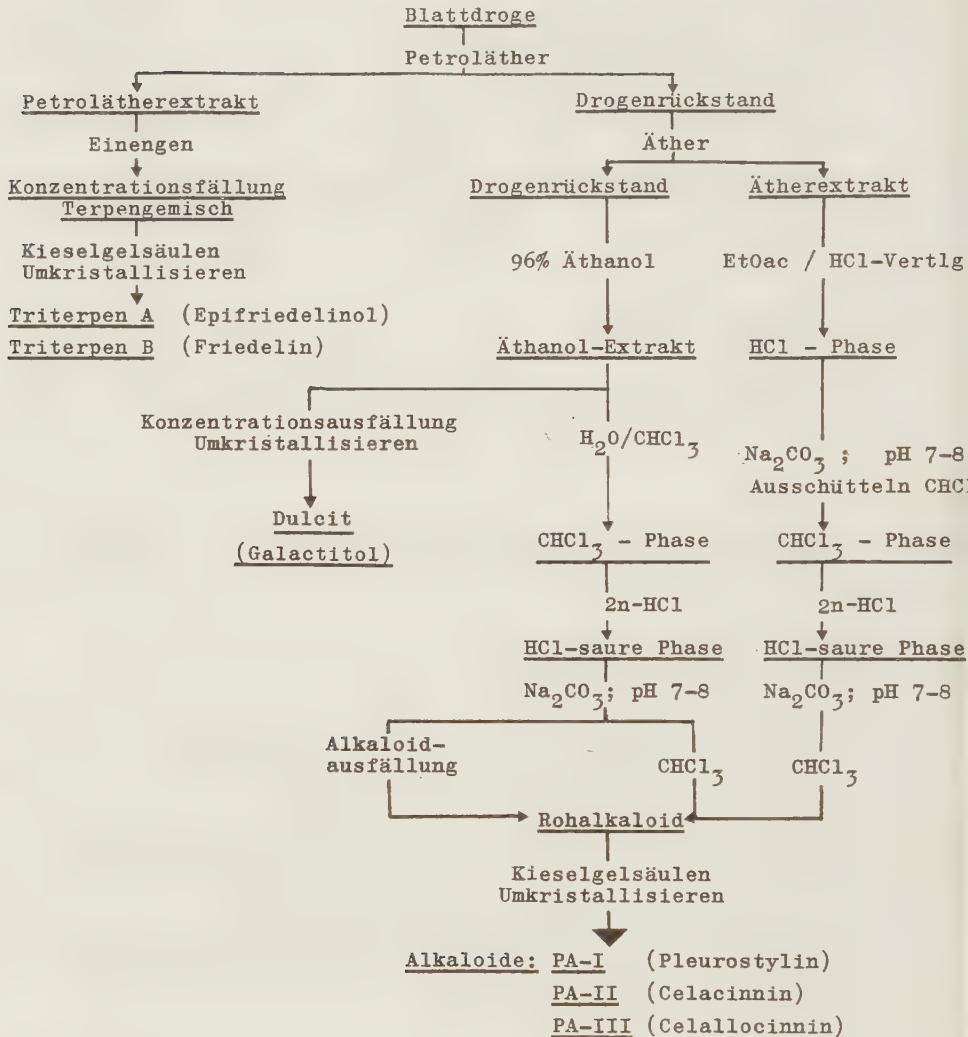


Abb. 8

5.3 Dünnschichtchromatographie und Isolierung der Alkaloidfraktion

Im Äther- und noch deutlicher im Äthanolextrakt ließen sich dünn-schichtchromatographisch Alkaloide nachweisen. Durch einige Reinigungsschritte mit Hilfe der Säure-Base-Verteilung konnte ein Rohalkaloidgemisch erhalten werden. Im Laufmittel Äthylacetat-Äthanol (90:10) ließen sich neben den drei Hauptalkaloiden (PA-I = Rf 0.54, PA-II = 0.49 und PA-III = Rf 0.40) noch weitere Verbindungen mit Dragendorff-positiver Reaktion nachweisen (s. Abb. 9). Zwischen dem Äther- und Äthanolextrakt war nur ein quantitativer Unterschied feststellbar. Zur Detektion der nur in Spuren vorhandenen Nebenalkaloide bewährte sich das Nachbesprühen des Dragendorff-Reagens mit 10% Natriumnitritlösung (61).

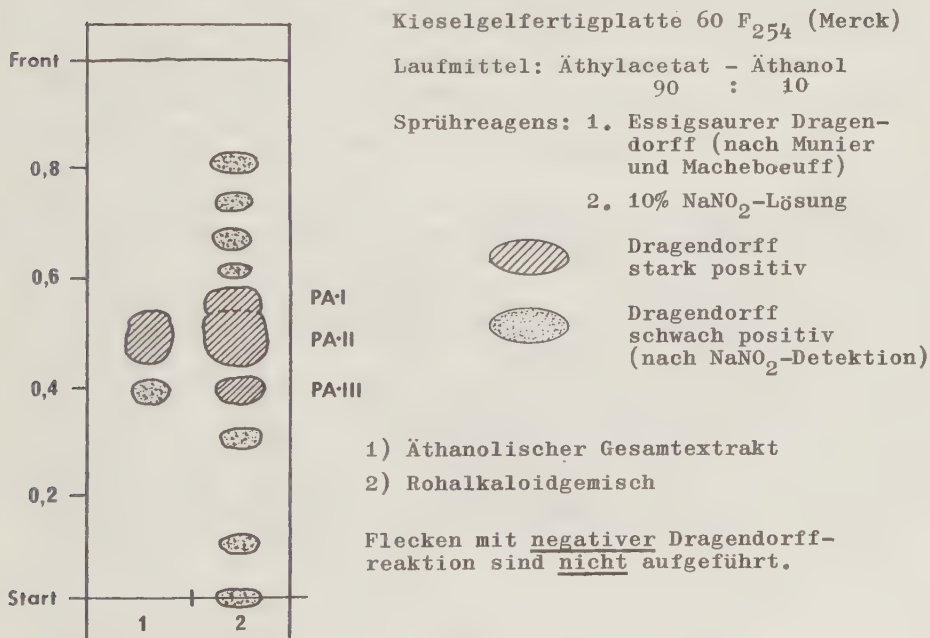


Abb. 9

DC der Alkaloide aus den Blättern von *Pleurostyliya africana*

Säulenchromatographie der Alkaloidfraktion

Die Auftrennung des Rohalkaloidgemisches erfolgte über Kieselgelsäulen im Laufmittelsystem Äthylacetat - Äthanol (87:13). Dadurch konnten die Hauptalkaloide im mittleren R_f-Bereich von Spurenalkaloiden und nichtalkaloidischen Verunreinigungen abgetrennt werden. Das Hauptalkaloid PA-II wurde zum Teil rein und PA-III in stark angereicherter Form erhalten. PA-I lag im Gemisch mit PA-II vor, doch war die relative Konzentration im Vergleich zum Rohalkaloid deutlich erhöht. Durch eine Chloroform-Butanol-2-Gradientenelution konnten PA-I und PA-II erfolgreich auf einer Kieselgelsäule getrennt werden. Dabei bewährte sich die Verwendung von besonders feinem Kieselgel (Merck, Korngröße unter 0,063). Durch Umkristallisieren ließen sich PA-I und PA-II reinst erhalten. Das bereits stark angereicherte Alkaloid PA-III wurde durch Säulenchromatographie mit einem Äthylacetat-Butanol-2-Gradienten rein erhalten.

PA-I : $C_{25}H_{29}N_3O_2$; Smp.: 246-247°; $[\alpha]_D^{25} = -19.4^\circ$
PA-II (= Mh 1) : $C_{25}H_{31}N_3O_2$; Smp.: 201-203°; $[\alpha]_D^{25} = -20.5^\circ$
PA-III(= Mh 2) : $C_{25}H_{31}N_3O_2$; Smp.: 175-177°; $[\alpha]_D^{28} = -21.8^\circ$

6.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mh 1/PA-II (Celacinnin)

Auf Grund des DC-Verhaltens konnte vermutet werden, daß es sich bei Mh 1 und PA-II um das gleiche Alkaloid handelte. Der Beweis gelang durch den Mischschmelzpunkt (ohne Depression) und das Überlagerungs-IR (s. Abb. 10). Aus den CHN-Werten und dem Molekülpeak $M^+ = 405$ ergibt sich eine Summenformel von $C_{25}H_{31}N_3O_2$. Die Substanz enthält 12 Doppelbindungsäquivalente und ist optisch aktiv, $[\alpha]_D^{25} = -20,5^{\circ}$ ($CHCl_3$, $c = 1,15$).

Im Massenspektrum sind die zwei intensivsten Bruchstücke m/e 131 und m/e 274 ($M^+ - m/e$ 131). Das deutete auf die Abspaltung einer Zimtsäuregruppe hin, die noch weiter fragmentiert, z.B. m/e 131 $\rightarrow$ m/e 103 $\rightarrow$ m/e 91 $\rightarrow$ m/e 77. Nach dem UV-Spektrum, $\lambda_{max} = 218, 223$ und 279 nm mit $\epsilon = 21500, 17600$ und 25200 , handelte es sich um ein trans-Zimtsäurechromophor (63).

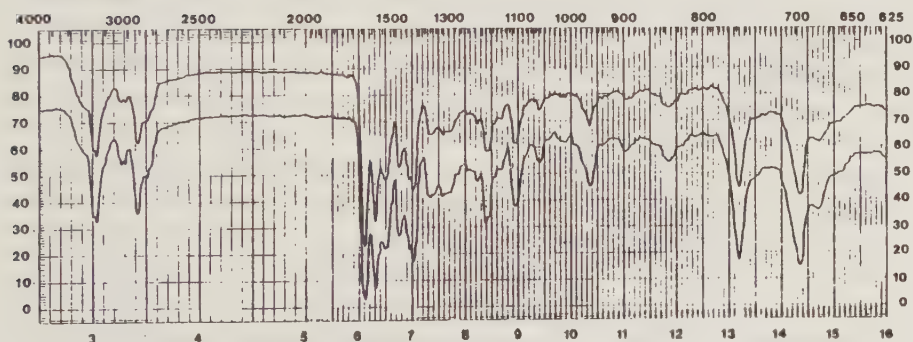


Abb. 10

Überlagerungs-IR-Spektrum von Mh 1 und PA-II (Celacinnin)

Das bestätigten auch zwei Dublette bei $\delta = 7,75$ und $6,85$ ppm im $60 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR-Spektrum}$ in CDCl_3^* und eine für die trans-Konfiguration typische Kopplungskonstante von $15,5 \text{ Hz}$ ($64,65$). Außerdem zeigten das $^1\text{H-NMR}$ ein mit DTFA austauschbares Amidproton und einen weiteren Phenylrest an. Die Integration ergibt nämlich 11 Protonen im Bereich von $\delta = 7,2\text{--}7,7 \text{ ppm}$. Die übrigen Protonen liefern breite Multiplettsignale zwischen $\delta = 1,2$ und $2,8 \text{ ppm}$, bzw. zwischen $\delta = 3,1$ und $4,1 \text{ ppm}$. Nur ein verbreiteres Triplet bei $\delta = 4,03 \text{ ppm}$ (1H , $J = 7 \text{ Hz}$) und ein Duplett bei $\delta = 2,53 \text{ ppm}$ (2H , $J = 7 \text{ Hz}$) waren in dem "Multiplettsberg" als Einzelsignale zu erkennen und ließen auf eine isolierte $>\text{CH-CH}_2$ -Gruppierung schließen*.

Katalytische Hydrierung über $10\% \text{ Pd/C}$ ergab eine Dihydroverbindung (Dihydrocelacinnin = Dihydro PA-II), $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2$. Das Verschwinden der beiden Dublette bei $\delta = 6,85$ und $7,75 \text{ ppm}$ im $^1\text{H-NMR}$ (s. Abb. 11 u. 12) zeigte, daß lediglich die olefinische Gruppe des Zimtsäurechromophors hydriert worden war. Das Massenspektrum zeigte die Abspaltung von Dihydrozimtsäure ($\text{M}^+ - m/e 133 \rightarrow m/e 274$), die entsprechend weiter fragmentierte, $m/e 133 \rightarrow m/e 105$.

Acetylierung von PA-II und Dihydro-PA-II ergab die Monoacetylverbindungen $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ (PA-II-Acetat) und $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3$ (Dihydro-PA-II-Acetat). Von den drei Stickstoffatomen mußten demnach zwei als Amid vorliegen. Dies bestätigten die Amidbanden bei 1640 und 1590 cm^{-1} im IR-Spektrum und zwei Carbonylsignale im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ (s. Abb. 20 und Tab. 4). Im Massenspektrum waren nebeneinander Abspaltungen einer Acetylgruppe ($\text{M}^+ - m/e 43$) und einer Zimtsäure- bzw. Dihydrozimtsäuregruppe ($\text{M}^+ - m/e 131$ bzw. $\text{M}^+ - m/e 133$) zu beobachten. Erstaunlicherweise trat bei Dihydro-PA-II-Acetat ein Zimtsäurefragment ($m/e 131$) von beachtlicher Intensität (41%) auf. Dieses war mit geringerer Intensität auch

* Die bessere Auflösung des $360 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR-Spektrums}$ von PA-II zeigt ebenso wie die Temperaturstudien in DMSO-d_6 , daß bei Raumtemperatur nebeneinander Signale von cis-trans-Amid-Konformeren vorliegen (s. Kap. 8, S. 33 ff). KUPCHAN und Mitarbeiter haben diese Tatsache in ihrem $100 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ anscheinend nicht bemerkt ($41,42$).

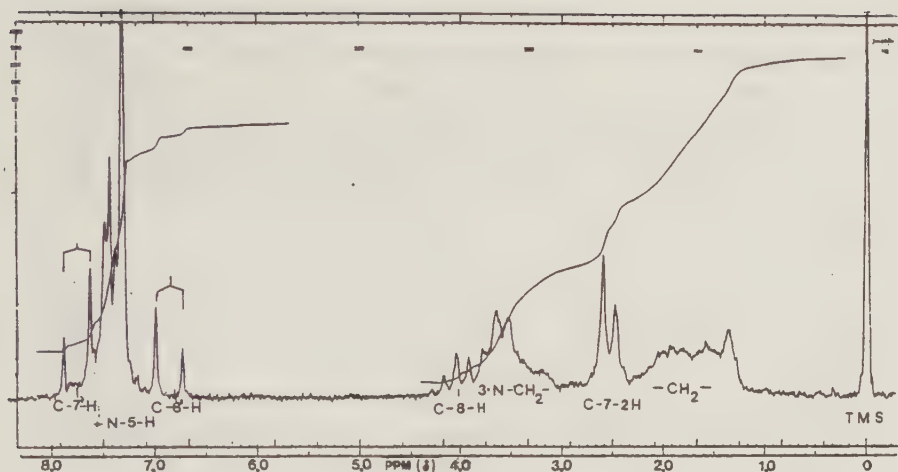


Abb. 11

60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Celacinnin (PA-II)
(in CDCl_3 , Raumtemperatur, TMS int.)

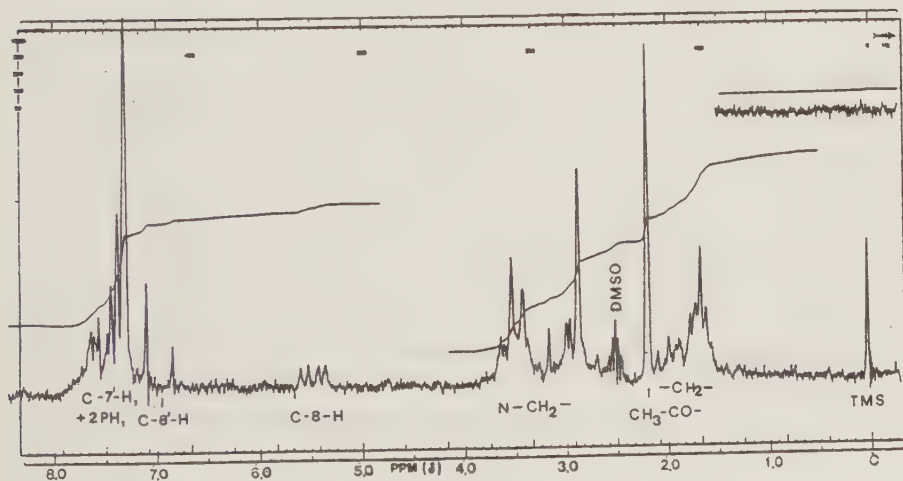


Abb. 12

60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Acetyl-Celacinnin (PA-II-Acetat)
(in DMSO-d_6 , 130°C , TMS int.)

im Dihydro-PA-II selbst zu beobachten. Die "zweite Zimtsäure" schien daher bevorzugt bei der MS-Fragmentierung der N-acetylierten Verbindung zu entstehen und mußte wohl im PA-II-Molekül als Dihydrozimtsäure in einem Ringsystem vorliegen. Der Hydrierung und Zahl der Doppelbindungsäquivalente zufolge sollte PA-II neben den beiden Phenylresten ein zusätzliches Ringsystem enthalten.

Im ^1H -NMR der Acetate von PA-II und Dihydro-PA-II fiel auf, daß im Vergleich zu den nicht acetylierten Alkaloiden das Signal für das einzelne Proton bei $\delta = 4,0$ ppm eine Tieffeldverschiebung nach $\delta = 5,5$ bis $5,8$ ppm erfuhr (s. Abb. 12). Dies sprach dafür, daß die ringverknüpfte Zimtsäure in β -Stellung, d.h. am benzyllischen Kohlenstoff mit dem acetylierbaren Stickstoff verknüpft sein mußte. Ein derartiges NMR-Verhalten, das für eine β -Phenylalaninstruktur spricht, wurde bereits bei der Strukturaufklärung des Sperminalkaloids Cheaenorrhin mit Hilfe der Modellsubstanz 4-Methoxy- β -(N-propylamin)-dihydrozimtsäure-propylamid beobachtet (66).

Zieht man zwei Zimtsäureeinheiten von der Summenformel von PA-II ab, so bleibt ein gesättigter C_7N_3 -Körper übrig, vermutlich das biogene Amin Spermidin, $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$.

HESSE und Mitarbeiter haben in zahlreichen Arbeiten das massenspektroskopische Verhalten von Polyaminen, bzw. der Alkaloide von Putrescin, Spermidin und Spermin untersucht (67,68,69,70). Liegen wie im N,N',N"-Triacetylspermidin alle drei Stickstoffatome in acylierter Form vor, so können neben Acyl-Abspaltungen charakteristische Peaktraden beobachtet werden. Sie werden nur durch Fragmentierungen innerhalb der N-(CH_2)₃-N-(Diaminopropan)-Einheit hervorgerufen. Unter der Voraussetzung, daß alle Acylreste frei abspaltbar sind und das endständige N-Atom der $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}$ -(Diaminobutan)-Einheit eine Acetylgruppe trägt, ist die Peaktriade m/e 143, 157 und 169 charakteristisch für Spermidinderivate (67,68).

Massenspektroskopische Fragmentierung von Acetyl-Dihydrocelaenin als triacyliertes Spermidinderivat

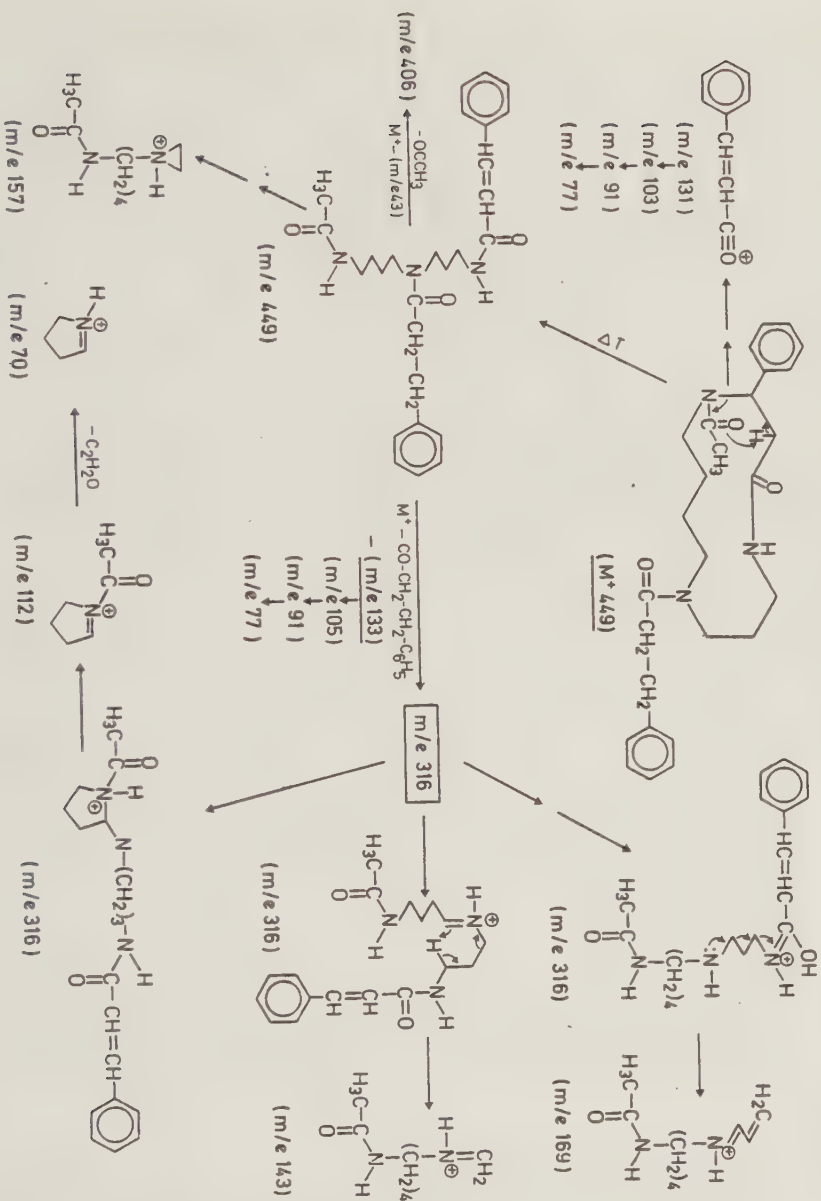


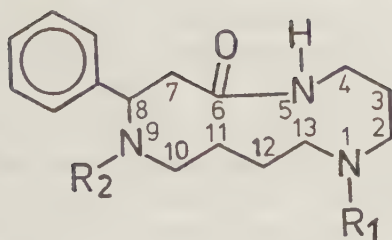
Abb. 13

Tatsächlich konnte bei den N-Acetylverbindungen von PA-II und Dihydro-PA-II durch eine derartige Peaktriade m/e 143, 157 und 169 (s. Abb. 13) auf das Vorliegen eines Spermidinalkaloides geschlossen werden. Das Fragment m/e 112 (s. Abb. 13) erlaubte zusätzlich einen Rückschluß auf den Einbau des Spermidins in das geforderte Ringsystem. Das Fragment m/e 112 enthält nämlich die Diaminobutaneinheit des Spermidins sowie die einzige Acetylgruppe des Gesamtmoleküls. Daher mußte die aus dem NMR abgeleitete β -Phenylalanin-Teilstruktur von PA-II durch Addition der endständigen Aminogruppe der $H_2N-(CH_2)_4-NH$ -Einheit des Spermidins an die Zimtsäure in β -Stellung erfolgt sein. Damit bleiben nur mehr zwei Strukturalternativen für PA-II, nämlich Ringschluß der Zimtsäure zu einem Lactam, entweder mit der mittelständigen NH-Gruppe des Spermidins unter Bildung eines 9-Ringsystems oder mit der endständigen NH_2 -Gruppe unter Ausbildung eines 13-gliedrigen Macrocyclus.

In Celastraceen war erstmals 1973 von Schweizer Autoren von einem Spermidinalkaloid, dem offenkettigen Maytenin, berichtet worden (40). 1974 folgte eine kurze Mitteilung aus dem Arbeitskreis KUPCHAN über Spermidinalkaloide mit 13-gliedrigem Macrocyclus* (41). Auf Grund der angegebenen Daten schien unser Mh 1 bzw. PA-II mit dem von KUPCHAN gefundenem Celacinnin identisch zu sein. Der Beweis für die Identität von Alkaloid Mh 1/PA-II mit Celacinnin (s. Abb. 14) konnte anhand der chemisch-physikalischen Daten und durch Vergleich mit dem IR- und 1H -NMR-Spektrum (100 MHz, $CDCl_3$) von authentischem Celacinnin erbracht werden.

Durch den Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie und von 360 MHz- 1H -NMR-Spektren konnten Details über Besonderheiten im NMR-Verhalten von Celacinnin und zusätzlich Argumente für die von KUPCHAN aufgestellte Struktur erhalten werden (S. Kap. 8.0, S. 33 ff).

* 1974 war von einem franz. Arbeitskreis das Spermidinalkaloid Periphyllin mit 8-gliedrigem Ringsystem publiziert worden (71) und gelangte in dieser Form auch in einige Übersichtsartikel (72,73). Inzwischen erfolgte die Revision der Struktur als 13-Macrocyclus (43) und Beweis durch Synthese (74). Eine Übersicht über die Spermidinalkaloide in Celastraceen ist auf S. 113 und 114 angegeben.



CELACINNIN	: $R_1 = \text{trans-PhCH=CHCO}$, $R_2 = \text{H}$
ACETYL-CELACINNIN	: $R_1 = \text{trans-PhCH=CHCO}$, $R_2 = \text{CH}_3\text{CO}$
DIHYDROCELACINNIN	: $R_1 = \text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $R_2 = \text{H}$
ACETYL-DIHYDROCELACINNIN	: $R_1 = \text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $R_2 = \text{CH}_3\text{CO}$
CELALLOINNIN	: $R_1 = \text{cis-PhCH=CHCO}$, $R_2 = \text{H}$

Abb. 14

Struktur von Celacinnin und Celallocinnin mit ihren Derivaten

7.0 Strukturaufklärung von Alkaloid PA-III (Celallocinnin)

PA-III besitzt wie Celacinnin (PA-II) die gleiche Summenformel $C_{25}H_{31}N_3O_2$. Der Schmelzpunkt ist mit 173° – $175^{\circ}C$ deutlich niedriger und die optische Drehung etwas höher $[\alpha]_D^{28} = -21.8^{\circ}$ ($c = 0,8$; in $CHCl_3$).

Im Massenspektrum von PA-III ist gegenüber PA-II kein Unterschied festzustellen. Die Abspaltung eines Zimtsäurerestes ($M^+ - m/e$ 131) ist die dominierende Fragmentierung. Die IR-Spektren sind ebenfalls einander sehr ähnlich. Bei PA-III fehlt jedoch die Bande bei 965 cm^{-1} , die wir einer trans-olefinischen Deformationsschwingung zugeordnet haben. Außerdem sind die Amid-Carbonylbanden (1630 und 1600 cm^{-1}) weniger gut aufgelöst. Das UV-Spektrum zeigt eine hypsochrome Verschiebung nach $\lambda_{\max} = 254\text{ nm}$ und eine deutlich niedrigere Absorptionsintensität ($\epsilon = 13400$). Beim Vergleich der 60-MHz- 1H -NMR-Spektren von PA-III und PA-II in $CDCl_3$ fällt als Hauptunterschied auf, daß bei PA-III die beiden Dublette eines AB-Systems bei höherem Feld ($6,67$ und $6,08\text{ ppm}$) und mit kleinerer Kopplungskonstante ($J = 12,5\text{ Hz}$) erscheinen. Die spektralen Daten lassen somit ein cis-Zimtsäurechromophor in PA-III als Hauptunterschied zu PA-II (Celacinnin) erkennen (65). Der endgültige Strukturbeweis für PA-III (Celallocinnin) wurde auf zwei Wegen erbracht.

Die katalytische Hydrierung von PA-III mit 10% Pd/C ergab Dihydro-PA-III, $C_{25}H_{33}N_3O_2$, das in allen chemisch-physikalischen Daten einschließlich Mischschmelzpunkt und Überlagerungs-IR (s. Abb. 17) mit dem Hydrierungsprodukt von PA-II (Dihydrocelacinnin) übereinstimmte.

Bei der DC von chromatographisch reinem PA-II (Celacinnin) war festgestellt worden, daß nach UV-Exposition der aufgetragenen Substanz bei nochmaliger Entwicklung ein zusätzlicher Substanzfleck mit gleichem R_f -Wert wie PA-III bzw. Mh 2 nachgewiesen werden konnte.

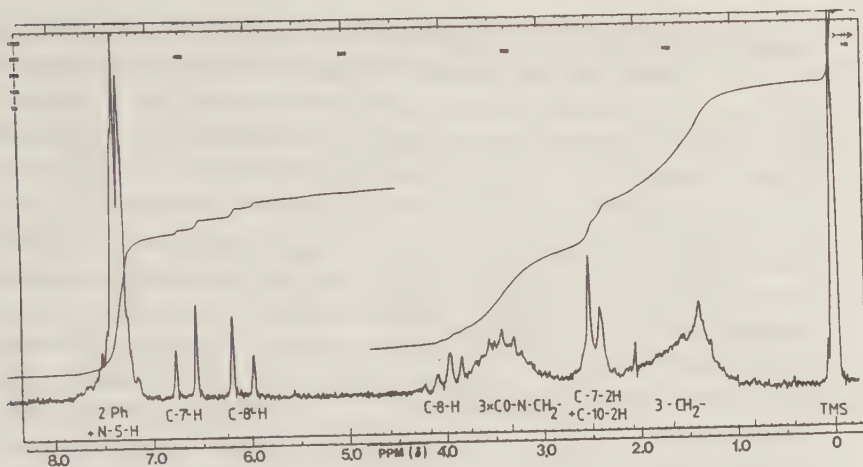


Abb. 15

60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Celallocinnin (PA-III)
(in CDCl_3 , Raumtemperatur, TMS int.)

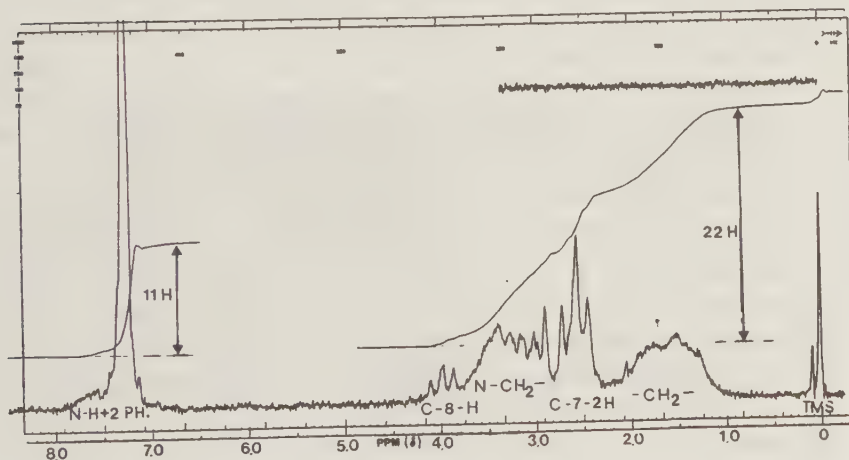


Abb. 16

60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Dihydrocelacinnin (Dihydro-PA-II/PA-III)
(in CDCl_3 , Raumtemperatur, TMS int.)

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde eine äthanolische Lösung von PA-II unter verschiedenen Bedingungen (neutrale, alkalische, HCl- bzw. essigsäure Lösung) mit langwelligem UV-Licht bestrahlt. Ein Essigsäurezusatz ergab die besten Ausbeuten an Umwandlungsprodukt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von KAHNT bei der trans-cis-Isomerisierung von Hydroxyzimtsäuren (75).

Nach mehrtägiger Bestrahlung von 75 mg Celacinnin in einer äthanolischen Lösung, die mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert worden war, konnten durch präparative DC 33 mg trans-olefinisches Ausgangsprodukt und 17 mg der isomeren cis-Cinnamoylverbindung erhalten werden. Die spektralen Daten (UV, IR, MS, NMR) stimmen mit dem aus *Pleurostylia africana* isolierten PA-III überein. Außerdem konnte dünnschichtchromatographisch gezeigt werden, daß sich umgekehrt auch PA-III durch UV-Bestrahlung zu einem Gemisch von PA-III/PA-II isomerisieren läßt.

PA-III unterscheidet sich daher von PA-II (Celacinnin) lediglich in der olefinischen Doppelbindung des Zimtsäurerestes und ist somit mit Celallocinnin (s. Abb. 14 S. 29) identisch (41,42).

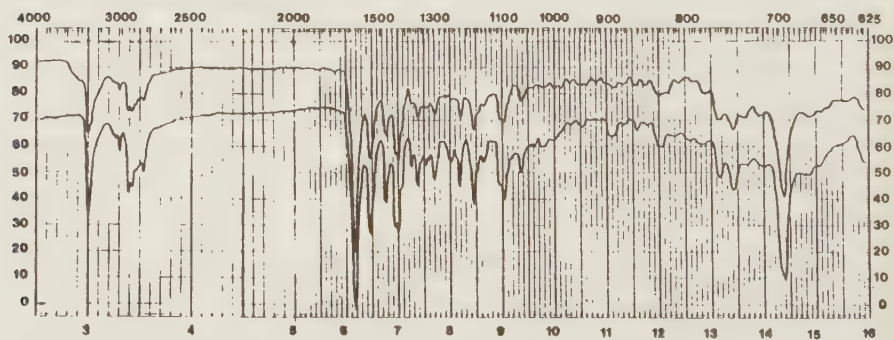


Abb. 17

Überlagerungs-IR von Dihydro-PA-II und Dihydro-PA-III (DIHYDRO-CELACINNIN)

8.0 Nachweis der cis-trans-Amid-Isomerie bei Celacinnin und Celallocinnin durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Das $360\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ von Celacinnin wies gegenüber dem 60 MHz- Spektrum und dem von KUPCHAN erhaltenen 100 MHz- Spektrum deutliche Unterschiede auf (Abb. 18). Es trat nicht die erwartete Vereinfachung der Spin-Systeme für ein Spektrum erster Ordnung ein. So zeigte die Cinnamoylgruppe für die beiden olefinischen Protonen nicht die erwarteten beiden Dublette eines AB-Systems, sondern für C-7'-H ein verbreitertes Dublett (1H , $15,5\text{ Hz}$) und für C-8'-H bei $6,78$ und $6,81\text{ ppm}$ zwei überlagerte Dublette (je $1/2\text{ H}$, $15,5\text{ Hz}$). Bei $4,0\text{ ppm}$ erschien C-8-H nicht als Triplett oder Doppeldublett, sondern als Multiplett mit mindestens 5 Linien. Zwei Triplette bei $7,87$ und $7,57\text{ ppm}$ integrierten zusammen für 1 Proton. Ihre Entkopplung führte in beiden Fällen zu Veränderungen der Multiplette bei ca. $3,5\text{ ppm}$ (3H) und bei ca. $3,0\text{ ppm}$ (1H). Besonders auffallend waren die Veränderungen des Multipletts zwischen $2,95$ und $3,05\text{ ppm}$. Dieses Multiplett integriert nur für 1 Proton und ist deutlich in zwei Teilbereiche gegliedert. Tatsächlich führte die Entkopplung bei $7,87\text{ ppm}$ (t, $1/2\text{ H}$) nur zur Veränderung im Teilbereich zwischen $3,05$ und $3,15\text{ ppm}$. Umgekehrt führte die Entkopplung bei $7,57\text{ ppm}$ (t, $1/2\text{ H}$) nur zur Veränderung des anderen Teilbereichs zwischen $2,95$ und $3,05\text{ ppm}$. Zweifellos handelte es sich in beiden Fällen um die Wechselwirkung zwischen Amid-NH und einem Proton der benachbarten CH_2 -Gruppe.

Somit sind in dem bei Raumtemperatur aufgenommenen $360\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Signale von 2 sehr ähnlichen Strukturen im Verhältnis $1:1$ nachweisbar. Die Aufnahme von Spektren mit Celacinnin aus einem anderen Aufarbeitungsweg brachten das gleiche Resultat. Einige Signale waren nach Lage und Aussehen etwas verändert, wenn anstelle CDCl_3 eine $5:1$ -Mischung von $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$ verwendet wurde. So lag das benzyliche Proton von C-8 bis $3,99\text{ ppm}$ als Doppeldublett (1H , $3\text{ Hz}/12\text{ Hz}$) vor. Das Amidproton erschien in zwei Signalen (je $1/2\text{ H}$) bei $7,81$ und $7,92\text{ ppm}$. Bei $6,85\text{ ppm}$ war ein Pseudotriplett vorhanden, das sich aus 2 Dubletten (je $1/2\text{ H}$) bei $6,83$ und

6,88 ppm zusammensetzte. Das Verhältnis der beiden Signale betrug ebenfalls 1:1.

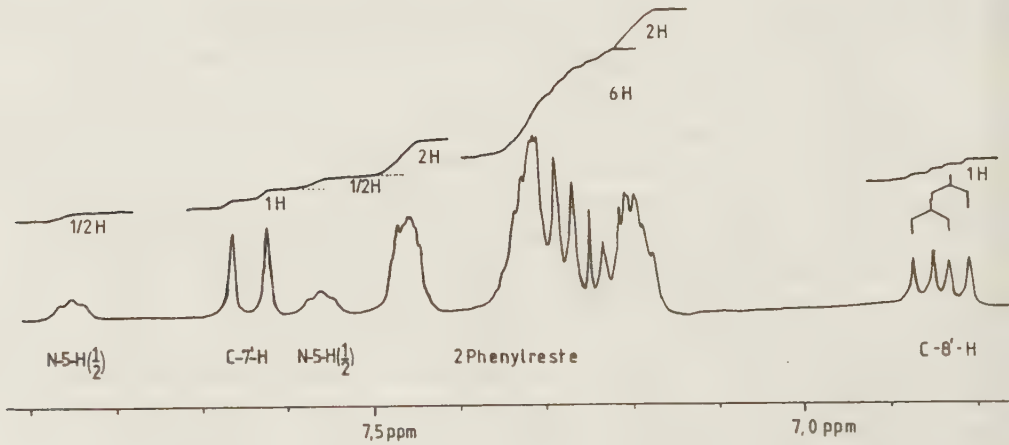
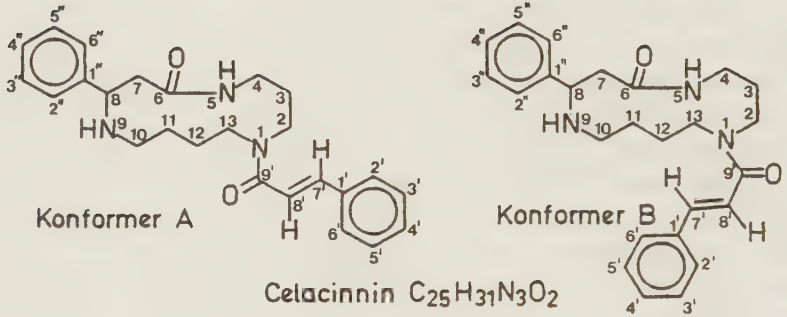


Abb. 18a

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Celacinnin (PA-II) bei Raumtemperatur: Aromatischer Teilbereich 6,8-7,9 ppm
($\text{CHCl}_3 = 7,25 \text{ ppm, int. St.}$)

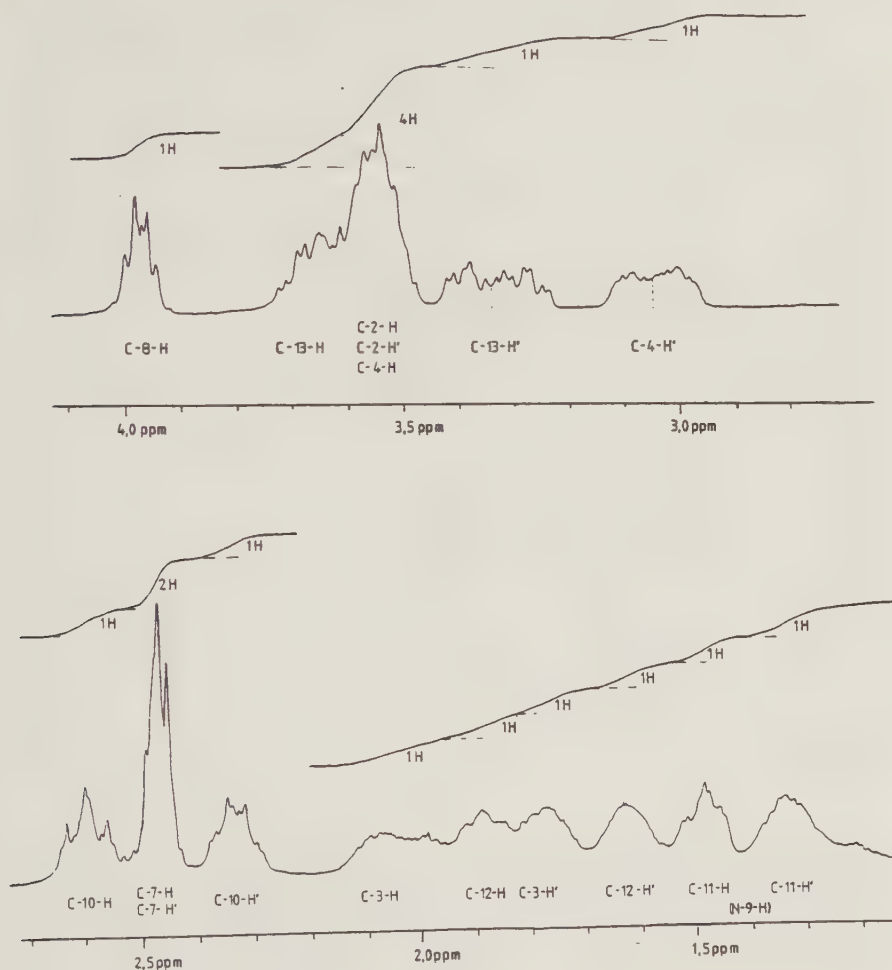


Abb. 18b

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Celacinnin (PA-II) bei Raumtemperatur : Aliphatischer Teilbereich 1,3-4,1 ppm ($\text{CHCl}_3 = 7,25$ ppm)

T a b e l l e 3

360 MHz-¹H-NMR-Spektraldaten von Celacinnin (Mh 1 / PA-II)
(CDCl₃, Raumtemperatur, CHCl₃ = 7,25 ppm int.St.)

	ppm	Spinsystem
<u>13-Macrocyclus:</u>		
C-2-H,H'	3,45-3,70	m überlagert von C-4-H u. C-13-H
C-3-H	1,95-2,15	m (1H)
C-3-H'	1,70-1,85	m etwas überlagert von C-12-H
C-4-H	3,45-3,60	m überlagert von C-2-H,H' u. C-13-H
C-4-H' (B)	2,95-3,05	m (1/2 H)
(A)	3,05-3,15	m (1/2 H)
N-5-H (A)	7,87	br. t (1/2 H)
(Amid) (B)	7,57	br. t (1/2 H)
C-7-H,H'	2,47	m ("d", 2H)
C-8-H	3,97	m (1H, mind. 5 Linien)
N-9-H	vermutlich bei 2,0	
C-10-H	2,50-2,67	m (1H)
C-10-H'	2,25-2,42	m (1H)
C-11-H	1,42-1,55	m (1H)
C-11-H'	1,20-1,42	m (1H)
C-12-H	1,80-1,95	m etwas überlagert von C-3-H,H'
C-12-H'	1,57-1,70	m (1H)
C-13-H	3,60-3,75	m z.Tl. überlagert von C-2-H,H'
C-13-H'	3,25-3,43	m (1H)
<u>Phenylrest am C-8:</u>		
C-2",6"-2H	7,15-7,25	m
C-3",4",5"-H	7,23-7,35	m überlagert vom Cinnamoylrest
<u>Trans-Cinnamoylrest am N-1:</u>		
C-2',4',6'-H	7,23-7,35	m überlagert vom Phenylrest am C-8
C-3',5'-2H	7,42-7,50	m (2H)
C-7'-H(α-H)	7,65	br.d (1H, J = 15,5 Hz)
C-8'-H(β-H)(A)	6,78	d (1/2 H, J = 15,5 Hz)
C-8'-H (B)	6,81	d (1/2 H, J = 15,5 Hz)

Die Zuordnung beruht auf Entkopplungsexperimenten. (A) bzw. (B) bezeichnet die Signale der beiden rotationsisomeren Strukturen, sofern sie im Spektrum getrennt nachweisbar sind.

Um mit Sicherheit auszuschließen, daß Celacinnin nicht aus einem Gemisch zweier echter Strukturisomere^{*} bestand, wurden die Spektren bei verschiedenen Temperaturen (60 MHz, s. Abb. 19) gemessen. Als Lösungsmittel wurde DMSO- d_6 verwendet. Das bei Raumtemperatur aufgenommene 60 MHz-Spektrum unterschied sich von dem unter gleichen Bedingungen aufgenommenem Spektrum in $CDCl_3$ recht beträchtlich. So war jetzt auch im 60 MHz-Spektrum gut zu sehen, daß die olefinischen Protonen der trans-Cinnamoyl-Gruppe nicht mehr als zwei Dublette eines AB-Systems vorlagen. Das benzyliche Proton C-8-H bei $\delta = 4,0$ ppm ergab kein Triplett, sondern ein Multipllett. Die Steigerung der Temperatur in Intervallen von 20° bis $30^\circ C$ zeigte eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Signale. So nahm mit steigender Temperatur die Breite der Signale zu Gunsten der Signalhöhe ab, so daß auch breite Multiplette zusehends "strukturierter" wurden. Ab ca. 110° war keine merkbare Veränderung des Spektrums mehr festzustellen. So war C-7'-H bei 7,0 ppm wieder ein klares Dublett (1H, 15,5 Hz). Das benzyliche Proton C-8-H erschien als klares Doppeldublett (1H, 5 Hz/8 Hz) und zeigte somit die Nichtäquivalenz der beiden Nachbarprotonen am C-7 an. Damit war gesichert, daß Celacinnin als Reinsubstanz vorgelegen hatte. Es liegt bei Raumtemperatur in Form zweier Konformerer vor. Da sich auch im 360 MHz- 1H -NMR die Signale der konformeren Strukturen in den meisten Fällen überlagern, ist eine Analyse der ohnehin komplexen Spin-Systeme nicht möglich. Mit zahlreichen Entkopplungsexperimenten konnte jedoch die von KUPCHAN aufgestellte Celacinninstruktur bestätigt und eine Zuordnung der Protonen gegeben werden (s. Abb. 18 und Tab. 3).

Der Grund für das Auftreten konformerer Strukturen ist nur auf die eingeschränkte Rotation der Amidbindung (C-N) zurückzuführen. Eine derartige Rotationshinderung ist von PHILIPPS beim Dimethylformamid erstmals mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen worden (76). PAULING hatte für die Rotationshinderung eine Energieschwelle von 21 kcal/mol vorausgesagt (77). Dies entspricht einem Doppelbindungscharakter von 40% und kommt dem für Dimethylformamid

^{*} Dihydroperiphyllin, das Strukturisomere des Celacinnins mit entgegengesetztem Spermidineinbau in den 13-Macrocyclus, war zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch unbekannt. Die 1977 vom Arbeitskreis CAVÉ veröffentlichten Daten zeigen auch tatsächlich eine große Ähnlichkeit mit Celacinnin (43).

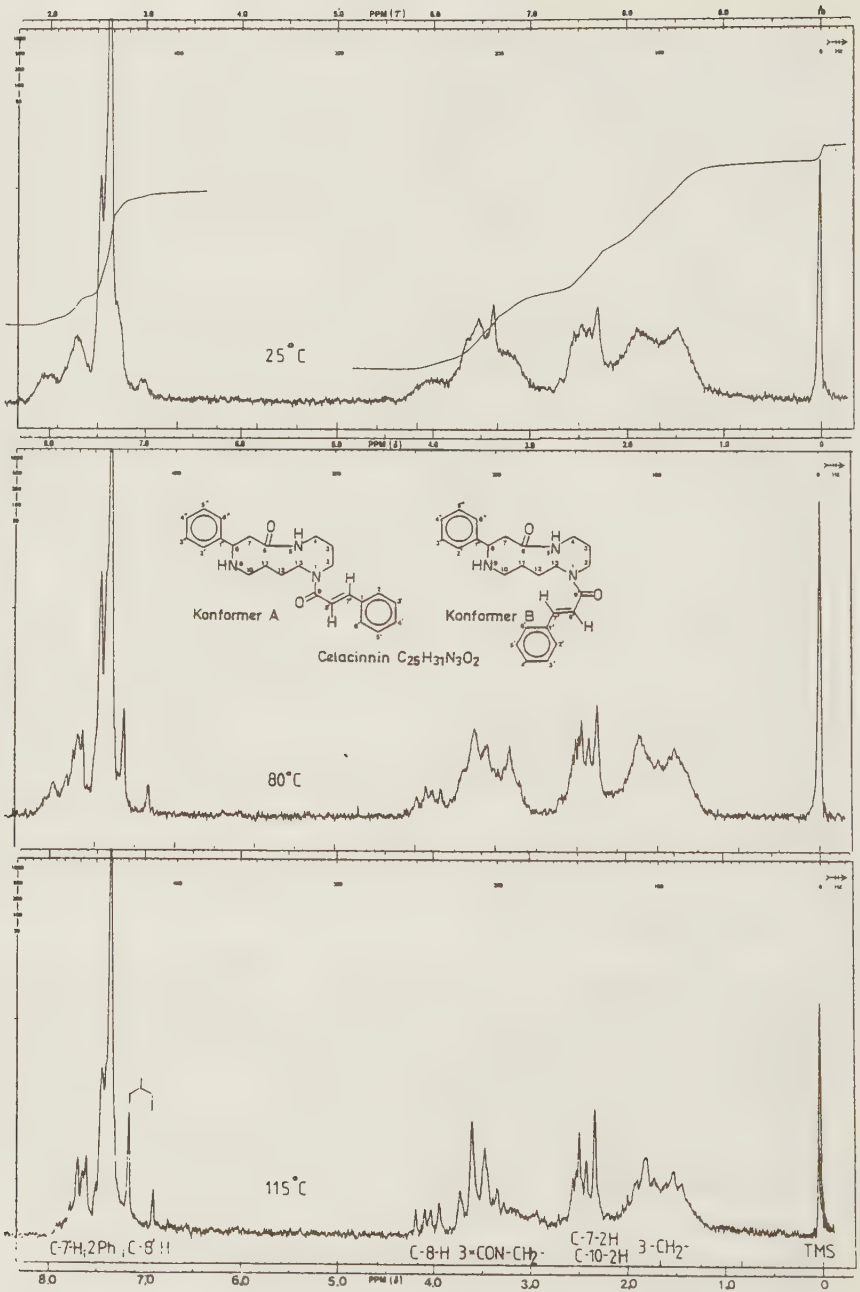
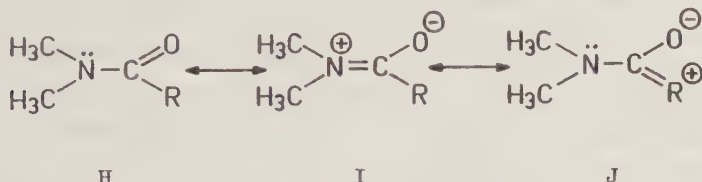


Abb. 19

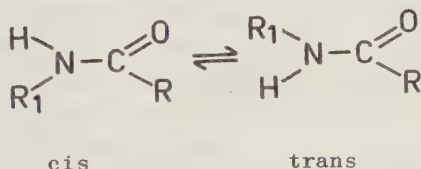
60 MHz- ^1H -NMR-Temperaturstudie von Celacinnin (PA-II) in $\text{DMSO}-d_6$

gemessenem Wert sehr nahe. Zahlreiche physikalisch-chemisch orientierte Arbeiten haben seither die elektronischen und sterischen Einflüsse von Substituenten auf den Doppelbindungscharakter der Amid-Bindung untersucht (78).



Die Rotation um die Amidbindung (C-N) ist durch die Beteiligung der Grenzstruktur I am Grundzustand erschwert. Eine starke Beteiligung der Grenzstruktur J an der Mesomerie senkt dagegen den Doppelbindungscharakter der Amidbindung und damit die Rotationschwelle (z.B. R = C₆H₅; R = OCH₃) (78). In einigen Fällen lassen sich die Rotationsisomeren sogar chromatographisch trennen (79).

Bei N-monosubstituierten Amiden haben die Rotameren verschiedenen Energiegehalt. Hier sind die Untersuchungen der cis-trans-Isomerie wegen der Peptidbindung von großem biochemischen Interesse. Während bei Formamiden (R = H) stets beide Rotamere nachweisbar sind, liegt bei höheren Amiden nur die Form vor, bei der die Reste R₁ und R trans-ständig angeordnet sind (78).

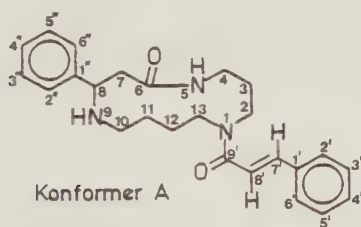
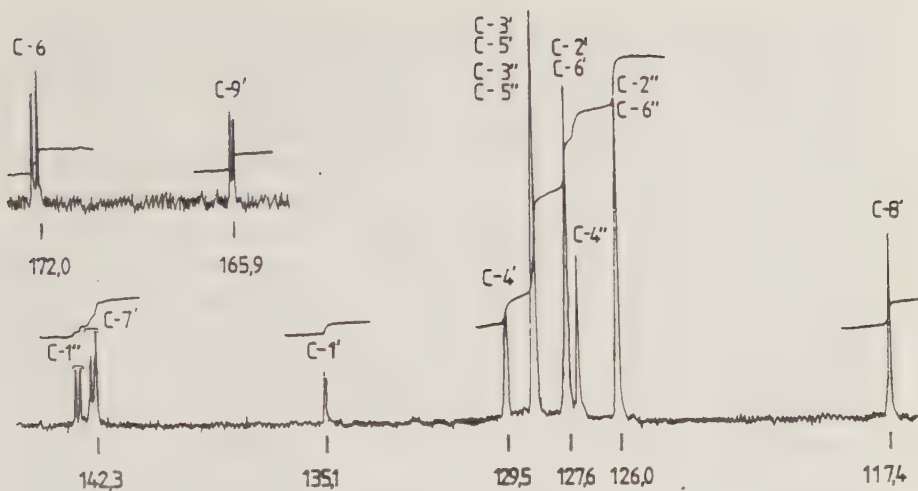


Bei den Lactamen ist die Ringgröße der entscheidende Faktor. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Molpolarisation benzolischer Lösungen der Lactame konnte HUISGEN schließen, daß Lactame bis zu 9 Ringgliedern eine cis-konfigurierte und mit 10 und mehr Ringgliedern eine trans-konfigurierte Amidgruppe besitzen (80). Das Auftreten einer Amid-II-Bande im IR wertete HUISGEN als empirisches Indiz für die trans-Amidgruppe (81). Der neungliedrige Lactamring liegt im kristallinen Zustand als trans-Amid und in Lösung überwiegend als cis-Amid vor (81). WILLIAMSON und ROBERTS konnten diese Ergebnisse mit ¹⁵N und ¹³C-NMR-Studien von Lactamen bestätigen (82).

Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie bietet eine gute Differenzierung der Signale über einen weiten ppm-Bereich. Infolge der Protonen-breitbandentkopplung erscheinen alle ^{13}C -Signale als Singulette, so daß auch bei größeren Molekülen die Überlagerung von Signalen kaum vorkommt. Außerdem kann im Gegensatz zur ^1H -NMR-Spektroskopie auch ein protonenfreier Kohlenstoff, wie der Carbonyl-Kohlenstoff untersucht werden. Daher kann bei größeren Molekülen, wie Celacinnin und Celallocinnin, die ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der cis-trans-Amid-Isomerie als Methode der Wahl bezeichnet werden. Interessant war beim Celacinnin, wie sich das gleichzeitige Vorkommen eines sekundären und eines tertiären Amids NMR-spektroskopisch auswirkt.

Das 67,88 MHz- ^{13}C -NMR von Celacinnin in CDCl_3 bei Raumtemperatur läßt auf den ersten Blick den "Konformereneffekt" erkennen. Die 9 aliphatischen Kohlenstoffatome ergeben 15 Einzelsignale. Auch im Bereich der Aromaten- und Carbonylkohlenstoffe zeigen einige Signale eine Aufspaltung oder zumindest Linienverbreiterung (s. Abb. 20). Die Integration der Signale durch "Inversed Gated Decoupling" und das häufige Auftreten von Signalaaren bestätigen, daß unter den gegebenen Aufnahmebedingungen zwei rotations-isomere Strukturen vom Celacinnin vorliegen. Dieser Effekt kann daher nur durch die cis-trans-Isomerie von einer der beiden Amid-Gruppen, nämlich dem tertiären Amid (N-1), hervorgerufen werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ROBERTS und den ^{13}C -NMR-Spektren der von uns entdeckten verbrückten Spermidin-alkaloide liegt die Amidbindung zwischen N-5 und C-6 ausschließlich als trans-Amid vor (82).

Eine ^{13}C -NMR-Studie von LEVY und NELSON an N,N-di-n-Butylformamid und N,N-di-n-Butylacetamid, zeigt deutlich den unterschiedlichen sterischen Einfluß der Amidgruppe auf die benachbarten CH_2 -Gruppen (83). Die δ -Werte bei tieferem Feld werden hier den Kohlenstoffatomen "cisoid" zum Formylproton bzw. "transoid" zum Carbonyl-Kohlenstoff zugeordnet. Erwartungsgemäß ist die Differenz in den δ -Werten bei den α -ständigen CH_2 -Gruppen am stärksten und nimmt einigermaßen linear mit zunehmendem Abstand zum Amidstickstoff ab. In einem so komplexen Molekül wie z.B. Celacinnin sind die Möglichkeiten sterischer Wechselwirkung wesentlich vielfälti-



Celacinnin $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$

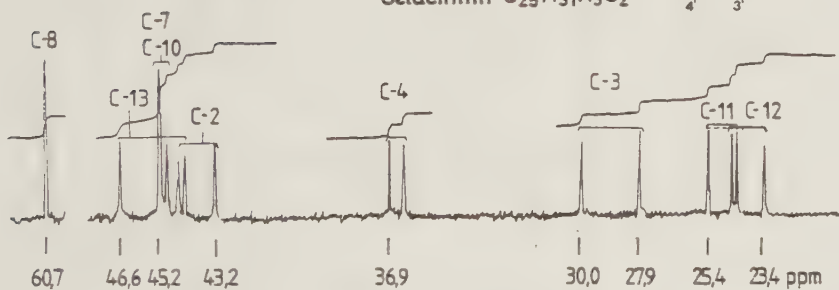
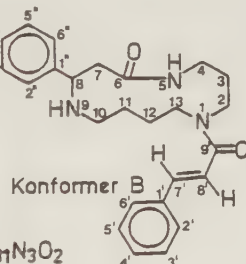


Abb. 20

67,88 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von Celacinnin (PA-II) bei Raumtemperatur ($\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm}$)

ger. Trotzdem wird auch hier in den meisten Fällen aus der Differenz der δ -Werte für ein Kohlenstoffatom die Nähe zum Amid-Stickstoff N-1 indirekt ersichtlich. Die größten $\Delta\delta$ -Werte besitzen daher C-1, C-3, C-12 und C-1. Entsprechend lassen C-7 und C-8 überhaupt keine Differenz in den δ -Werten erkennen. Erstaunlich ist allerdings, daß C-1" eine Aufspaltung von immerhin 0,15 ppm zeigt, während die übrigen aromatischen Kohlenstoffe der beiden Phenylreste keinen "Konformereneffekt" mehr zeigen. Auch die zwei Signale für das olefinische C-7' sind überraschend, da das benachbarte C-8' nur als Einzelsignal vorliegt. Derartige Besonderheiten müssen durch gewisse sterische Wechselwirkungen ("steric compression shifts") verursacht sein. Auch das Lösungsmittel scheint hier eine Rolle zu spielen.

In Abb. 21 sind die DMSO- d_6 -Spektren von Celacinnin bei 50° und 130° einander gegenübergestellt. Bei 130° ist die Rotation um die Amidbindung für das NMR genügend "schnell", so daß die Signale koaleszieren. Wir beobachten daher bei 130° in einem "gemittelten Spektrum" für die 9 aliphatischen C-Atome auch genau 9 Signale (s. Abb. 21, Tab. 4).

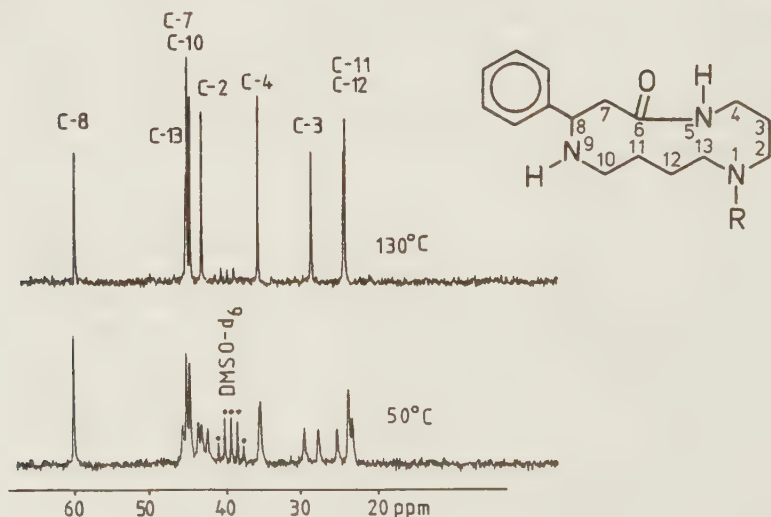


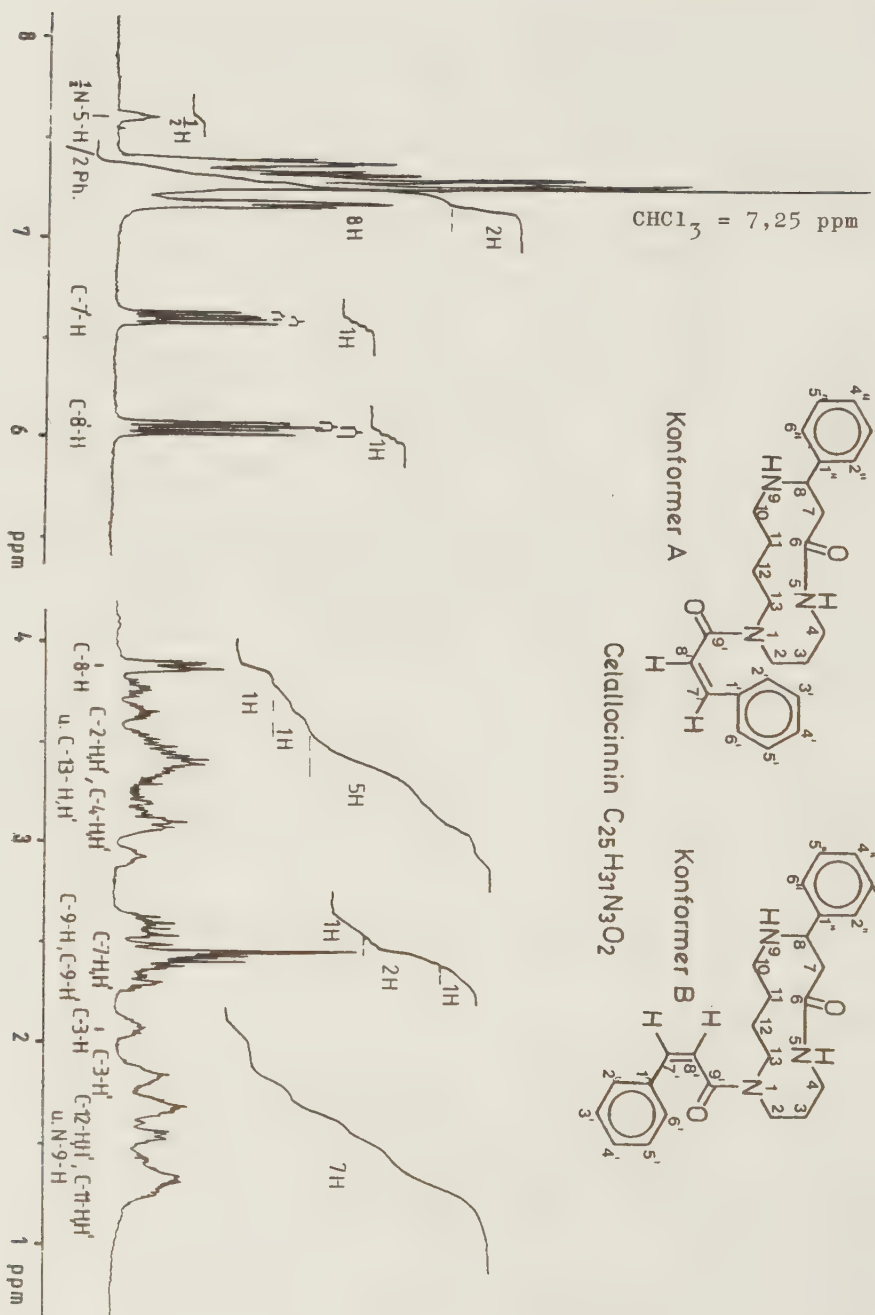
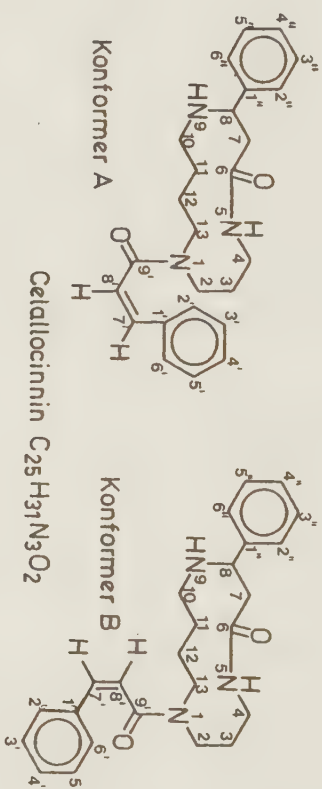
Abb. 21

^{13}C -NMR-Temperaturstudie von Celacinnin (PA-II) in DMSO- d_6 :
Aliphatischer Teilbereich (25,2 MHz, TMS int.)

T a b e l l e 4 : ^{13}C -NMR-Spektraldaten von Celacinnin (Mh 1/PA-II)

C-Atom	67,88 MHz CDCl ₃ =77,0 ppm Raumtemperatur δ (ppm) Δδ (ppm)	25,2 MHz DMSO-d ₆ / TMS 50°C δ (ppm) Δδ (ppm)	25,2 MHz DMSO-d ₆ / TMS 130°C δ (ppm)			
<u>13-Macrocyclus:</u>						
C-2	44,50x 43,20	1,30	43,91x 42,66	1,25	42,97	(t)
C-3	29,98 27,87	2,11	29,99 27,15	1,74	28,51	(t)
C-4	36,87 36,37	0,50	35,86 35,76	0,10	35,57	(t)
C-6	172,18 172,02	0,16	171,09	-	170,45	(t)
C-7	45,20	-	45,45	-	45,01	(t)
C-8	60,73	-	60,80	-	59,70	(d)
C-10	45,20 44,89	0,31	45,00	-	44,86	(t)
C-11	24,53xx 24,34	0,19	24,13xx 23,83	0,30	24,24	(t)
C-12	25,39xx 23,36	2,03	25,71xx 23,63	2,08	24,05	(t)
C-13	46,60 44,26x	2,34	46,04 43,51x	2,53	44,50	(t)
<u>Trans-Cinnamoylrest an N-1:</u>						
C-1'	135,11 135,06	0,05	135,27	-	135,08	(s)
C-2' (6')	127,63	-	127,78	-	126,98	(d)
C-3' (5')	128,44	-	128,57	-	127,98	(d)
C-4'	129,48	-	129,16	-	128,38	(d)
C-7'	142,44 142,27	0,17	140,84	-	139,85	(d)
C-8'	117,44	-	118,78	-	119,04	(d)
C-9'	165,99 165,87	0,12	164,78	-	164,69	(s)
<u>Phenylrest an C-8:</u>						
C-1"	142,93 142,78	0,15	144,06	-	143,62	(s)
C-2" (6")	126,03	-	126,28	-	125,73	(d)
C-3" (5")	128,44	-	128,22	-	127,62	(d)
C-4"	127,26	-	126,53	-	125,94	(d)

x, xx : Diese Zuordnungen sind vertauschbar

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Celallocinnin (PA-III) in CDCl_3 bei Raumtemperatur

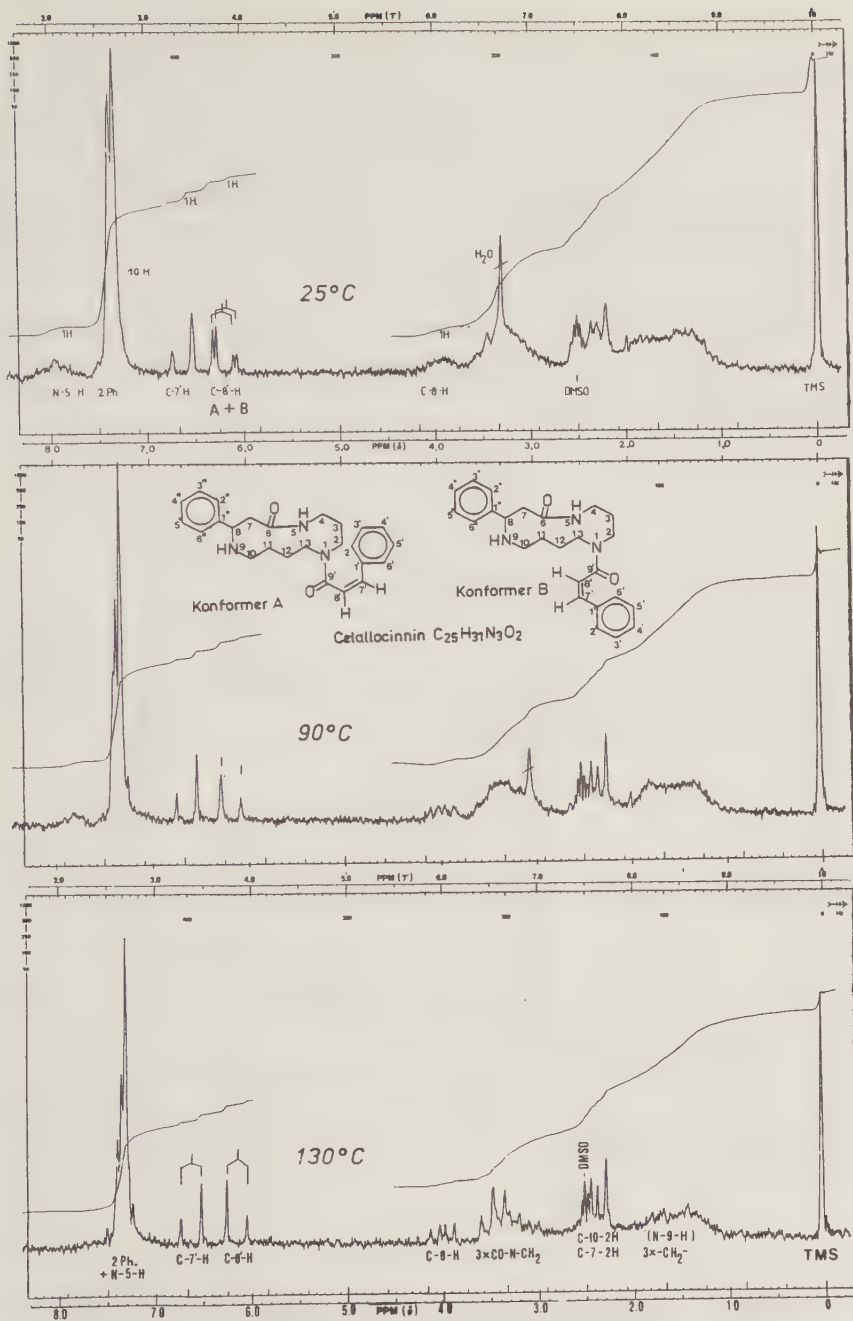


Abb. 23

60 MHz ^1H -NMR-Temperaturstudie von Celallocinnin (PA-III) in DMSO-d_6 (TMS int.)

Celallocinnin, das sich von Celacinnin lediglich durch die *cis*-Cinnamoylgruppe unterscheidet, sollte sich im Bezug auf die *cis-trans*-Isomerie der Amidbindungen ähnlich verhalten. Auch hier zeigte die bessere Auflösung des 360 MHz-¹H-NMR-Spektrums, daß zwei *cis-trans*-Amid-Konformere bei Raumtemperatur vorlagen. Am besten wird dies wiederum beim AB-System der beiden olefinischen Protonen der Cinnamoyl-Gruppe sichtbar. C-8'-H und auch C-7'-H sind in je zwei Dublette mit der Kopplungskonstanten $J = 12,3 \text{ Hz}$ aufgespalten (s. Abb. 22). In DMSO-d₆ ist dieser Effekt auch im 60 MHz-Spektrum durch die Temperaturabhängigkeit der Signale nachweisbar (s. Abb. 23).

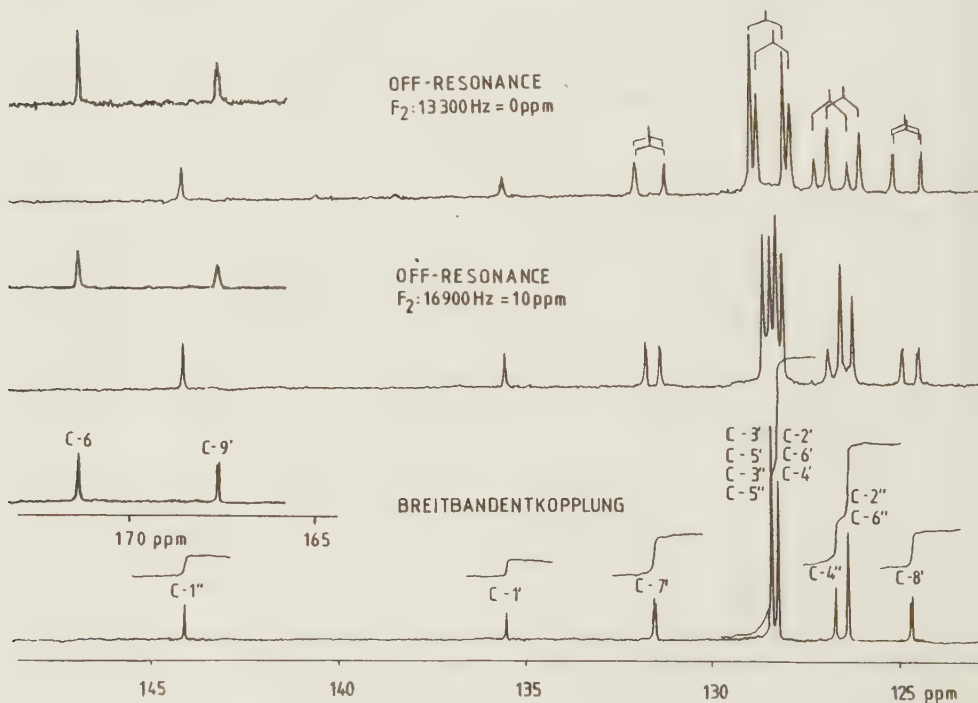


Abb. 24a

90,52 MHz-¹³C-NMR von Celallocinnin (PA-III): Aromatenregion
(DMSO-d₆ = 39,5 ppm; Raumtemperatur)

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von Celallocinnin wurde ebenfalls in DMSO-d_6 bei Raumtemperatur aufgenommen. Durch die Integration und die hervorragende Auflösung des 90,52 MHz-Spektrums sind für die 9 aliphatischen Kohlenstoffatome alle 18 Signale der beiden Konformeren nachweisbar (s. Abb. 24b). Die Differenz der δ -Werte vergleichbarer C-Atome ist bei Celallocinnin im Vergleich zu Celacinnin eher geringer, jedoch in besserer linearer Beziehung zum Abstand vom Amidstickstoff N-1. So zeigen in der Aromaten- und Carbonylregion nur drei C-Atome eine geringe Aufspaltung, nämlich C-9', C-8' und C-7'. Die Aromatenregion ist auch deshalb linienarm, weil bei 128,23 ppm 3 CH-Gruppen und bei 128,39 ppm 4 CH-Gruppen in Resonanz treten. Für die Zuordnung der ^{13}C -Signale wurde das DMSO-d_6 -Spektrum von Pleurostylin (PA-I) und das Off-Resonance-Spektrum bei zwei verschiedenen Frequenzen F_2 (s. Tab. 5) herangezogen.

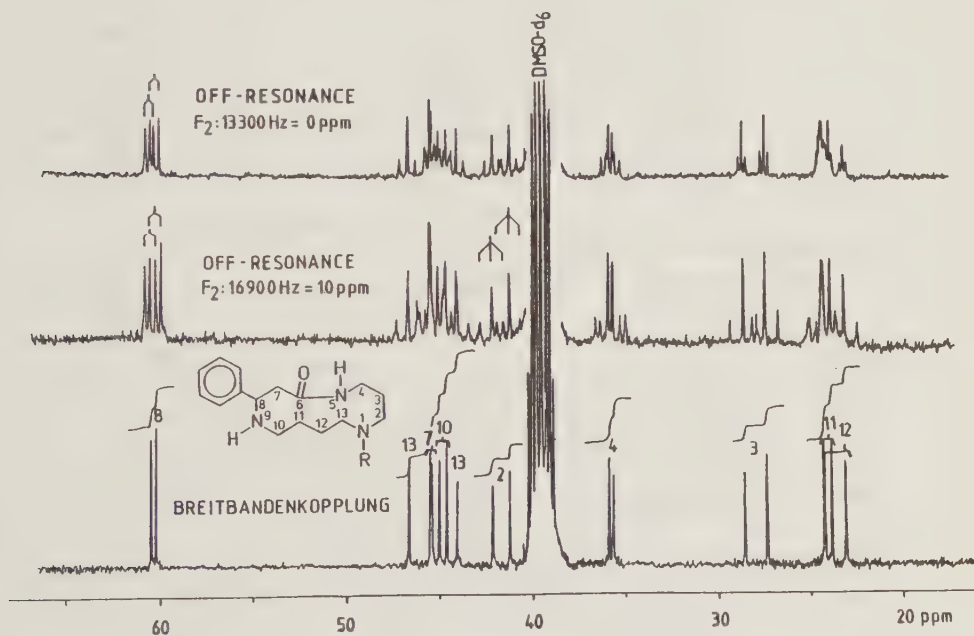


Abb. 24b

90,52 MHz- ^{13}C -NMR von Celallocinnin (PA-III): Aliphatenregion
($\text{DMSO-d}_6 = 39,5 \text{ ppm}$: Raumtemperatur)

T a b e l l e 5: ^{13}C -NMR-SIGNALE VON CELALLOCIINNIN (PA-III)
(90,52 MHz; Raumtemp., DMSO- d_6 = 39,5 ppm int. St.)

C-Atom	$\delta(\text{ppm})$	$\Delta\delta(\text{ppm})$	$J_R(\text{Hz})$ für Off-Resonance bei F_2 : 16900 Hz = 10 ppm u. 13300 Hz = 0 ppm	
<u>13-Macrocyclus:</u>				
C-2	42,14	0,92	t 58	t 36
	41,22		t 58	t 36
C-3	28,55	1,19	t 63	t 18
	27,36		t 63	t 18
C-4	35,83	0,24	t 60	t 34
	35,59		t 60	t 34
C-6	171,31	-	s -	s -
C-7	45,47	0,06	t 61	t 24
	45,41		t 61	t 24
C-8	60,47	0,28	d 54	d 41
	60,19		d 54	d 41
C-10	45,00	0,38	t 63	t 26
	44,62		t 62	t 26
C-11	24,28	0,36	t 68	t 15
	23,86		t 68	t 15
C-12	24,21	1,11	t 63	t 15
	23,10		t 63	t 14
C-13	46,64	2,59	t 58	t 33
	44,05		t 58	t 34
<u>Cis-Cinnamoylrest am N-1:</u>				
C-1'	135,54	-	s -	s (br)
C-2', 6', 4'	128,23	-	d 30	d 79
C-3', 5'	128,39	-	d 32	d 77
C-7'	131,54	0,03	d 36	d 70
	131,51			
C-8'	124,72	0,04	d 38	d 66
	124,68			
C-9'	167,58	0,04	s -	"d" (3J_R !)
	167,54			
<u>Phenylrest am C-8:</u>				
C-1"	144,15	-	s -	s -
C-2", 6"	126,38	-	d 31	d 76
C-3", 5"	128,39	-	d 32	d 77
C-4"	126,71	-	d 32	d 78

Die Werte für die Restkopplung 2J_R sind angenäherte Werte

9.0 Strukturaufklärung von Alkaloid PA-I (Pleurostylin)

Die CH-Analyse und das hochaufgelöste Massenspektrum ($M^+ = 403,226$) ergaben für PA-I eine Summenformel von $C_{25}H_{29}N_3O_2$. Gegenüber Celacinnin (PA-II) und Celallocinnin (PA-III) weist PA-I demnach ein Doppelbindungsäquivalent mehr auf. Die optische Drehung beträgt in Chloroform $[\alpha]_D^{24} = -194^\circ$.

PA-I lieferte bei der Acetylierung mit Pyridin/Eisessig eine Monoacetylverbindung $C_{27}H_{31}N_3O_3$ und bei katalytischer Hydrierung mit 10% Pd/C ein Dihydroderivat, $C_{25}H_{31}N_3O_2$.

Das UV-Spektrum von PA-I zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie das UV-Spektrum von PA-III (Celallocinnin). Das Maximum bei 267 nm war zwar gegenüber PA-III um etwa 12 nm bathochrom verschoben, der ϵ -Wert ($\epsilon = 11700$) in guter Übereinstimmung mit einem cis-Zimtsäurechromophor (65,84). Das UV-Spektrum des PA-I-Acetats war gegenüber dem von PA-I unverändert. Das UV-Spektrum des Dihydro-PA-I zeigte dagegen das Fehlen des Zimtsäurechromophors an. Es traten nur geringe Absorptionen bei $\lambda_{max} = 252, 258, 264$ und 268 mit $\epsilon = 460, 490, 420$ und 310 auf.

PA-I zeigte im IR-Spektrum (s. Abb. 25) eine auffallende Ähnlichkeit mit PA-II und PA-III. Bei 3290 cm^{-1} befand sich eine NH-Bande, bei $1620\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ die C=O-Streckschwingung eines

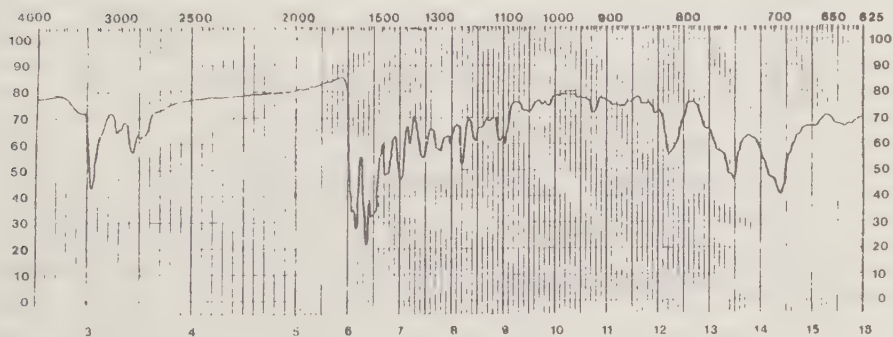


Abb. 25

IR-Spektrum von Pleurostylin (PA-I)

Amids und bei 2920 cm^{-1} aliphatische CH-Valenzschwingungen. Auf ein aromatisches System, vermutlich ein monosubstituiertes Benzolderivat, deuteten die Signale bei 695 und 740 cm^{-1} . Eine Bande mittlerer Intensität bei 815 cm^{-1} sprach für ein cis-Olefin in Konjugation zu einer Carbonylgruppe (85). Im IR von Dihydro-PA-I fehlte diese Bande.

Im $60\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) unterschied sich PA-I von Dihydro-PA-I nur durch zwei Dublette bei $6,17\text{ ppm}$ (1H , $J = 12\text{ Hz}$) und $7,12\text{ ppm}$ (1H , $J = 12\text{ Hz}$), ein weiterer Hinweis auf eine cis-Cinnamoyl-Verbindung (65). Das zusätzliche Doppelbindungsäquivalent in PA-I im Vergleich zu PA-II und PA-III sollte daher durch einen Ringschluß verursacht sein. Interessanterweise ergab die Integration im Bereich $7,2\text{--}7,8\text{ ppm}$ nur 9 aromatische Protonen. Das Signal für das einzelne Proton bei $4,0\text{ ppm}$ kommt auch in PA-II und PA-III vor und ist im PA-I-Acetat nach $\delta = 5,6\text{ ppm}$ verschoben. Daraus kann in Analogie zu Celacinnin (PA-II) auf eine β -Phenylalaninstruktur geschlossen werden (42). Im auffälligen Gegensatz zu PA-II und PA-III liegt bei $\delta = 4,7\text{ ppm}$ ein Signal für ein Proton, das von der Acetylierung kaum beeinflusst wird. Auf Grund der Lage bei relativ tiefem Feld sollte es sich

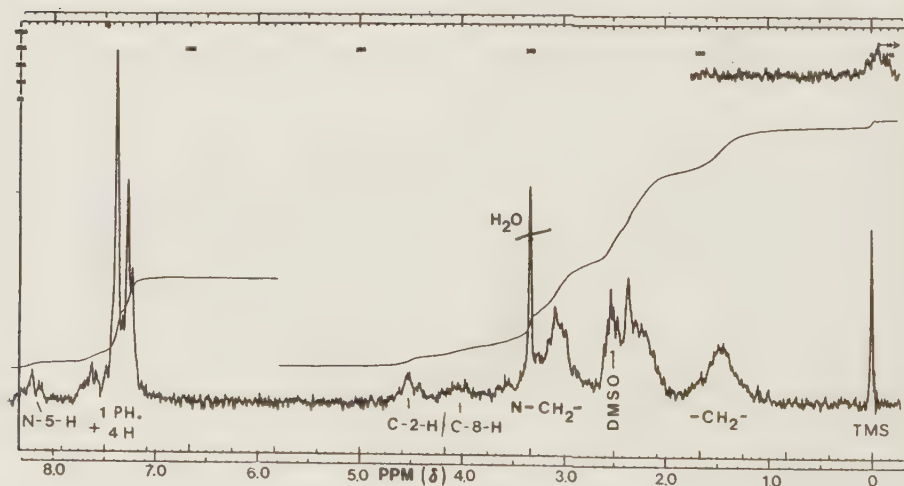


Abb. 26

$60\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dihydro-Pleurostylin (Dihydro-PA-I)
(DMSO-d_6 , TMS int.)

an einem Kohlenstoff in Nachbarstellung zu einem Stickstoff befinden. Allerdings waren weitere Rückschlüsse auf die Struktur bei der ungenügenden Auflösung des 60 MHz- ^1H -NMR-Spektrums und ohne die Möglichkeit von Entkopplungsexperimenten nicht möglich.

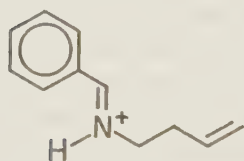
Im Massenspektrum von PA-I war ein Zimtsäurebruchstück (m/e 131,049 = $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}$; m/e 91,055 = C_7H_7 ; m/e 77,038 = C_6H_5) nachweisbar. Allerdings war das Zimtsäuresignal nur von mittlerer Intensität (20%) und somit nicht der Basispeak.

Erstaunlicherweise war weder bei PA-I die Abspaltung einer Zimtsäure ($M^+ - 131$), noch bei Dihydro-PA-I die Abspaltung einer Dihydrozimtsäure ($M^+ - 133$) festzustellen. Beim PA-I-Acetat wird zunächst aus dem Molekülion ($M^+ = 445$) ein Acetylrest abgespalten ($M^+ - m/e 43 \rightarrow m/e 402$) und erst als Folgereaktion ein Cinnamoylrest ($m/e 402 - m/e 131 \rightarrow m/e 271$). Eine parallel verlaufende Acetyl- und Cinnamoylabspaltung, wie z.B. bei Acetyl-Celacinnin (PA-II-Acetat) findet nicht statt.

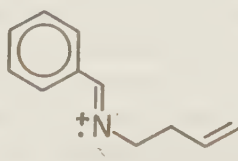
Das massenspektroskopische Verhalten läßt zusammen mit den bisherigen spektroskopischen Daten folgenden Schluß zu:

- 1) PA-I enthält wie PA-II und PA-III eine ringverknüpfte Zimtsäure, die daher auch im MS von Dihydro-PA-I nachweisbar ist und im MS der Acetylverbindung verstärkt auftritt.
- 2) Die im UV, IR und ^1H -NMR (s. Abb. 28 u. 29) nachgewiesene cis-Zimtsäure wird aus dem Molekülion nicht abgespalten. Sie muß daher im Phenylrest eine weitere Verknüpfung aufweisen, wodurch auch das zusätzliche Doppelbindungsäquivalent von PA-I gegenüber den um 2 Wasserstoffatomen reicheren Spermidinalkaloiden PA-II und PA-III erklärt wird.
- 3) Damit scheint PA-I ebenfalls ein macrocyclisches Spermidinalkaloid zu sein, das allerdings innerhalb der Spermidinkette eine Verbrückung aufweist. Deshalb fehlt im PA-I-Acetat die Peaktriade m/e 143, 157, 169 (vgl. Abb. 13), die nach HESSE für acetylierte Spermidinderivate typisch ist (67,68).

- 4) Der Basispeak bei m/e 70 (C_4H_8N) im MS von PA-I und Dihydro-PA-I und das zusätzliche Auftreten eines intensiven Fragments bei m/e 112 nur im MS von PA-I-Acetat deuten darauf, daß die $N-(CH_2)_4-N$ -Einheit des Spermidins nicht der Ort der Verbrückung sein kann. (vgl. Abb. 13, S. 27).
- 5) Darüber hinaus erfordern die Massenbruchstücke bei m/e 160,111 = $C_{11}H_{14}N$ (ber. 160,113) und m/e 159,103 = $C_{11}H_{13}N$ (ber. 159,105) im hochaufgelösten MS von PA-I die gleiche β -Phenylalaninstruktur und den gleichen Spermidineinbau wie bei Celacinnin (PA-II) (41,42).



m/e 160



m/e 159

- 6) Sehr intensive Signale bei m/e 146 im MS von PA-I und Dihydro-PA-I ergeben bei Hochauflösung neben $C_{10}H_{12}N$ (m/e 146,097, ber. 146,097) vor allem ein Zimtsäureamidbruchstück C_9H_8NO (m/e 146,060, ber. 146,061). Da zugleich auch eine C_9H_8NO -Abspaltung aus dem Molekülion auftritt, spricht dies nach KUPCHAN für einen Einbau der gesamten Spermidinkette in ein 13-gliedriges Ringgerüst und gegen die Alternativstruktur mit 9-gliedrigem Lactamring und exocyclischer Aminopropyleinheit (42).

9.1 Oxydativer Abbau von PA-I (Pleurostylin)

Um zu klären, ob die Zimtsäure in ortho-, meta- oder para-Stellung substituiert war, führten wir einen oxydativen Abbau von PA-I in sodaalkalischer Kaliumpermanganatlösung durch.

Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte über präp. DC im Laufmittel Disopropyläther-Ameisensäure-Wasser 90:7:3 (86). Durch die Massenspektren und den DC-Vergleich in mehreren Laufmitteln konnte ortho-Phthalsäure und Benzoesäure nachgewiesen

werden. Die Zimtsäure ist demnach in ortho-Position verbrückt. Auch die Versuche mit dem Dreiding-Molekülmodell ließen die ortho-Substitution als allein sinnvoll erscheinen.

9.2 ^{13}C -NMR-Untersuchung von PA-I (Pleurostylin)

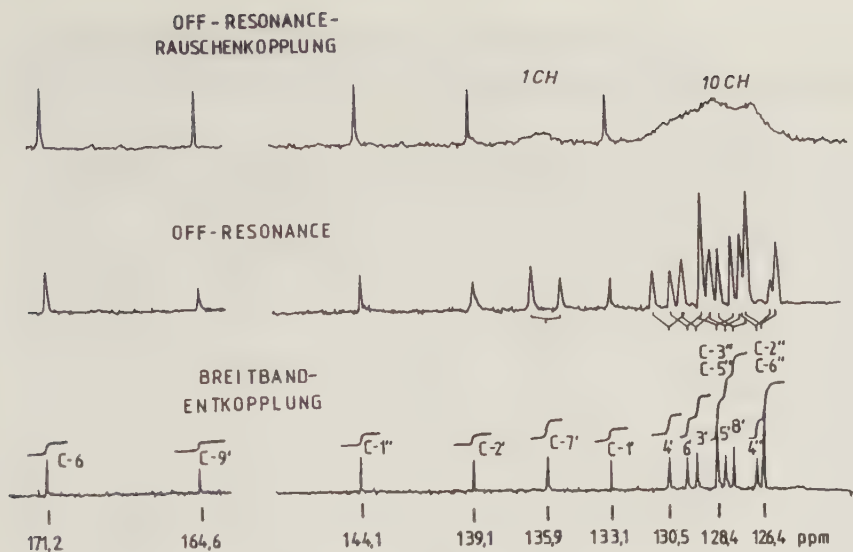
Das ^{13}C -NMR-Spektrum von PA-I ist im Vergleich zu den Spektren von PA-II und PA-III bei Raumtemperatur wesentlich linienärmer. Die Signale bei $\delta = 126,4$ und $128,4$ ppm integrieren für je 2 Kohlenstoffe und können daher den beiden ortho- bzw. meta-Kohlenstoffen eines monosubstituierten Benzolrings zugeordnet werden. Die Integration ergibt außerdem, daß trotz der hohen Auflösung des $67,88$ MHz-Spektrums in $\text{DMSO}-d_6$ zwei Signale bei $46,0$ ppm sich zufällig überlagern*. Damit können alle 25 C-Atome in Form von 22 Signalen nachgewiesen werden. Das Off-Resonance-Spektrum zeigt im aliphatischen Bereich sieben Triplette von CH_2 -Gruppen und zwei Dublette von CH-Gruppen. Das Dublett bei $58,4$ ppm kann in Analogie zu PA-II und PA-III der CH-Gruppe der β -Phenylalanin-Teilstruktur zugeordnet werden. Das andere Dublett bei $58,5$ ppm entspricht der geforderten Verknüpfungsstelle innerhalb der Diaminopropaneinheit der Spermidinkette, und zwar in α -Stellung zu einem der beiden N-Atome der $\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{-N}$ -Einheit. Dementsprechend zeigt das mittlere, β -ständige C-Atom (C-3; $\delta = 32,5$ ppm, t) der Diaminopropaneinheit eine Tieffeldverschiebung von ca. 4 ppm, während die Signale bei $22,0$ und $22,5$ ppm den beiden mittleren Kohlenstoffatomen der unsubstituierten Diaminobutaneinheit zugeordnet werden können.

Neben der routinemäßigen Off-Resonance-Entkopplung (Single Frequency Off Resonance Decoupling = SFORD) wurde auch eine Off-Resonance-Rauschentkopplung (Off Resonance Noise Decoupling = ORND) durchgeführt. Mit dieser Methode kann man

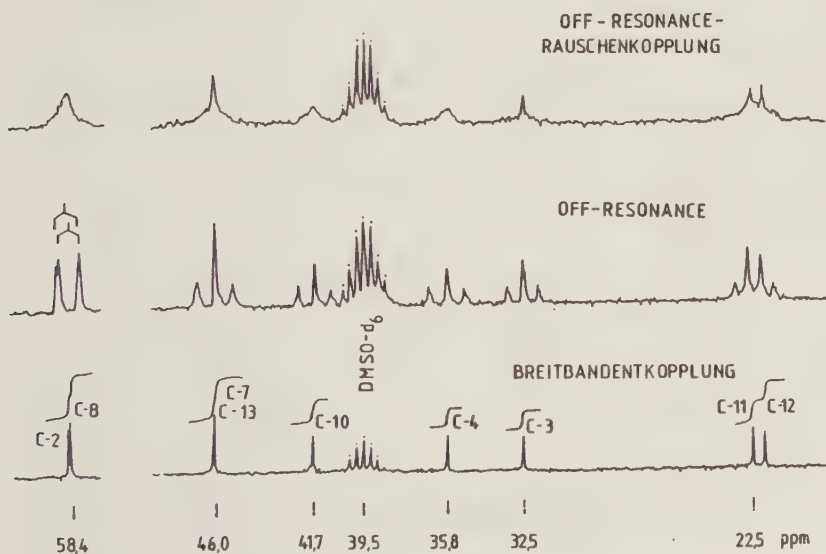
* Im CDCl_3 wurde aus Löslichkeitsgründen nur ein rauschentkoppeltes ^{13}C -Spektrum ($22,6$ MHz) gemessen. Hier tritt diese Überlagerung nicht auf (s. Tab. 6, S. 56).

in ähnlicher Weise wie durch Protonen-Breitbandentkopplung mit kleiner Senderleistung ("Low Power Noise Decoupling") sehr gut quarternäre C-Atome im Spektrum lokalisieren (87). Dies ist bei der Interpretation komplizierter ^{13}C -Spektren deshalb von Bedeutung, weil infolge der langen Relaxationszeiten und des geringen Overhausereffektes die Signale von quarternären C-Atomen meist intensitätsschwach sind und von den intensiveren Signalen protonierter Kohlenstoffe überlagert sein können. Infolge unvollständiger Entkopplung bilden dabei CH_n -Gruppen verbreiterte Signale geringerer Amplitude, so daß quarternäre C-Atome sich im Spektrum als scharfe Signale abzeichnen (88,89). So sind im ORND-Spektrum von PA-I (s. Abb. 27a) deutlich fünf Singulettsignale zu erkennen, zwei Amidsignale bei 171,2 und 164,6 ppm und drei quarternäre aromatische Kohlenstoffe, entsprechend einem mono- und einem disubstituierten Benzolring. Das Signal für C-1' der cis-Zimtsäure (133,1 ppm) ist gegenüber PA-II und PA-III um ca. 2 ppm nach hohem Feld verschoben und stellt ein weiteres Argument für die Verknüpfung in ortho-Position dar.

ROTH konnte zeigen, daß die Off-Resonance-Rauschentkopplung (ORND) auch zur Beurteilung sekundärer Kohlenstoffe verwendet werden kann (90). Scharfe Signale für sekundäre Kohlenstoffe treten auf, wenn die beiden direkt gebundenen Protonen chemisch äquivalent sind. Bei chemisch nichtäquivalenten Protonen steht die Linienbreite des ^{13}C -Signals mit der Differenz der chemischen Verschiebungen beider Protonen in linearem Zusammenhang. So zeigen die CH_2 -Gruppen bei 22,0 und 32,5 ppm bei Off-Resonance-Rauschentkopplung ein deutlich schärferes Signal als die CH_2 -Gruppen bei 22,5 und 35,8 ppm (s. Abb. 27b). Da im ^1H -NMR die nichtäquivalenten Protonen am C-11 und C-4 eine wesentlich größere Verschiebungsdifferenz gegenüber den Protonen am C-12 und C-3 aufweisen, kann eine Unterscheidung auf diese Weise getroffen werden (s. Tabelle 6).



^{13}C -NMR von Pleurostylin (PA-I): a) Aromatenregion



^{13}C -NMR von Pleurostylin (PA-I): b) Aliphatenregion

T a b e l l e 6: ^{13}C -NMR-Spektraldaten von Pleurostylin (PA-I)
Vergleich mehrerer unter verschiedenen Bedingungen (Konzentration, Lösungsmittel) gemessener Spektren:

22,63 MHz CDCl_3 i.St. TMS	22,63 MHz DMSO-d_6 i.St. TMS	67,88 MHz DMSO-d_6 =39,5 ppm	Off-Resonance (SFORD)	C- Atome	Zuordnung
171,21	171,00	171,23	s	1	C-6
165,28	164,41	164,58	s	1	C-9'
141,54	143,81	144,09	s	1	C-1''
138,41	138,95	139,12	s	1	C-2'
136,04	135,72	135,85	d	1	C-7'
132,91	132,91	133,09	s	1	C-1'
130,32	130,43	130,51	d	1	++ C-4'
129,24	129,70	129,70	d	1	++ C-6'
128,92	129,14	129,27	d	1	+ C-3'
128,50	128,27	128,39	d	2	C-3''(5'')
127,84	127,84	128,02	d	1	+ C-5'
127,52		127,66	d	1	C-8'
127,30	127,52	126,70	d	1	C-4''
125,90	126,33	126,44	d	2	C-2''(6'')
CDCl_3 :					
77,03					
59,88	58,47	58,53	d	1	C-2
59,01	58,26	58,42	d	1	C-8
47,15	45,96	46,04	t	(1) 2	C-13
44,88				(1)	C-7
42,18	41,64	41,73	t	1	C-10
	DMSO-d_6 :	DMSO-d_6 :			
	39,37	39,50			
36,46	35,71	35,83	t	1	C-4
33,23	32,54	32,50	t	1	C-3
23,09	22,44	22,56	t	1	C-11
21,90	22,01	22,03	t	1	C-12

+, ++: Diese Zuordnungen sind vertauschbar

9.3 Hochfeld- ^1H -NMR und Struktur von Pleurostylin (PA-I)

Bei der hohen Auflösung des 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrums wirken die Signale von DMSO-d_6 und H_2O wesentlich weniger störend. Der Wechsel von einer konzentrierteren DMSO-d_6 -Lösung (50 mg PA-I/0,4 ml; Spektrum 1) auf eine verdünntere CDCl_3 - DMSO-d_6 -Mischung (Verhältnis 5:1, 5 mg PA-I/0,4 ml; Spektrum 2) wirkt sich auf die Lage und Feinstruktur einiger Signale deutlich merkbar aus (s. Abb. 28 u. 29 bzw. Tab. 7 u. 8). Trotzdem sind in Übereinstimmung mit dem ^{13}C -NMR und im Gegensatz zu PA-II und PA-III bei Raumtemperatur definierte Spinsysteme zu beobachten und kein Nebeneinander registrierbarer konformerer Strukturen. Dies ist ein weiterer Beweis, daß in PA-I kein 9-gliedriger Lactamring vorliegt. Nach den ^{13}C -NMR-Untersuchungen von ROBERTS liegt bei Raumtemperatur der 9-Lactamring als Gemisch von cis-trans-Amid-Konformeren vor (82).

Die Lage der Verknüpfung innerhalb der Spermidinkette kann durch Doppelresonanzexperimente ermittelt werden. Entkopplern des Doppeldubletts (1H, $J = 10.5 / 3 \text{ Hz}$) bei $\delta = 4,65 \text{ ppm}$ (360 MHz - Spektrum 1) bewirkt eine Veränderung der Multipllettstruktur eines 2-Protonensignals bei 2,0 ppm. Demnach handelt es sich dabei um die mittelständige CH_2 -Gruppe (C-3-2H) der Diaminopropaneinheit. Wird nun seinerseits bei 2,0 ppm eingestrahlt, so wird aus dem Doppeldublett bei 4,65 ppm ein Singulett. Außerdem sind Veränderungen der Multiplette bei 3,05 und 2,66 ppm (je 1H) zu beobachten, die ihrerseits wieder untereinander und mit dem Amidproton bei 8,15 ppm koppeln. Damit ist nochmals der Beweis für die Verknüpfung innerhalb der Diaminopropaneinheit des Spermidins erbracht und gleichzeitig deren Protonensequenz festgelegt. Die aliphatische Verknüpfungsstelle liegt in α -Stellung zum tertiären und in γ -Stellung zum sekundären Amidstickstoff, d.h. am Kohlenstoff C-2 unter Ausbildung eines 7-gliedrigen Lactamringes.

Durch weitere Entkopplungsexperimente kann auch die Protonensequenz der vier CH_2 -Gruppen der Diaminobutaneinheit

T a b e l l e 7

¹H-NMR-Spektraldaten von Pleurostylin (360 MHz-Spektrum 1)
(50 mg PA-I/0,4 ml DMSO-d₆ ; DMSO = 2,49 ppm, int. St.)

	ppm	Spin- system	Integral (Protonen)	Kopplungen	J (Hz)
<u>13-Macrocyclus:</u>					
C-2-H	4,65	dd	1H	J _{2/3} = 10,5 ; J _{2/3'} = 3	
C-3-H,H'	1,95-2,15	m	2H	J _{2/3} = 10,5 ; J _{2/3'} = 3	
C-4-H	3,05	m	1H	J _{4/4'} = 14 ; J _{4/5} = 4	
C-4-H'	2,66	m	1H	J _{4'/5} = 6,5 ;	
N-5-H(Amid)	8,15	br.t	1H	J _{4'/5} = 6,5 ; J _{4/5} = 4	
C-7-H	2,42	t(dd)	1H	J _{7/7'} = 13 ; J _{7/8} = 12	
C-7-H'	2,29	dd	1H	J _{7/7'} = 13 ; J _{7'/8} = 3	
C-8-H	4,00	dd	1H	J _{7/8} = 12 ; J _{7'/8} = 3	
N-9-H(Amin)	2,0-3,0				
C-10-H	2,56	ddd	1H	J _{10/10'} = 12 ; J _{10/11} = 8	
C-10-H'	2,19	m(ddd)	1H	J _{10/10'} = 12 ; J _{10'/11} = 4	
C-11-H	1,35-1,50	m	1H	J _{10/11} = 8 ; J _{10'/11} = 4,	
C-11-H'	1,15-1,30	m	1H	J _{10/11'} = 5 ; J _{10'/11'} = 6	
C-12-H,H'	1,57-1,71	m	2H		
C-13-H	3,40-3,55	m		von H ₂ O-Signal überlagert	
C-13-H'	3,25-3,40	m	2H	J _{13/13'} = 12,5	
<u>ortho-substituierter cis-Cinnamoylrest am N-1 und Phenylrest am C-8:</u>					
C-6'-H	7,65	dd	1H	J _{ortho} = 6,5-7 ;	
C-3',4',5'- 3H und	7,27	m	7H	J _{meta} = 1,5-2,0	
C-2'',3'', 5'',6''-4H	7,46				
C-4''-H	7,22	m	1H		
C-7'-H	7,06	d	1H	J _{7'/8'} = 12,5	
C-8'-H	6,15	d	1H	J _{7'/8'} = 12,5	

Die Zuordnung erfolgte auf Grund von 15 Entkopplungsexperimenten.
Die Kopplungskonstanten sind angenäherte Werte

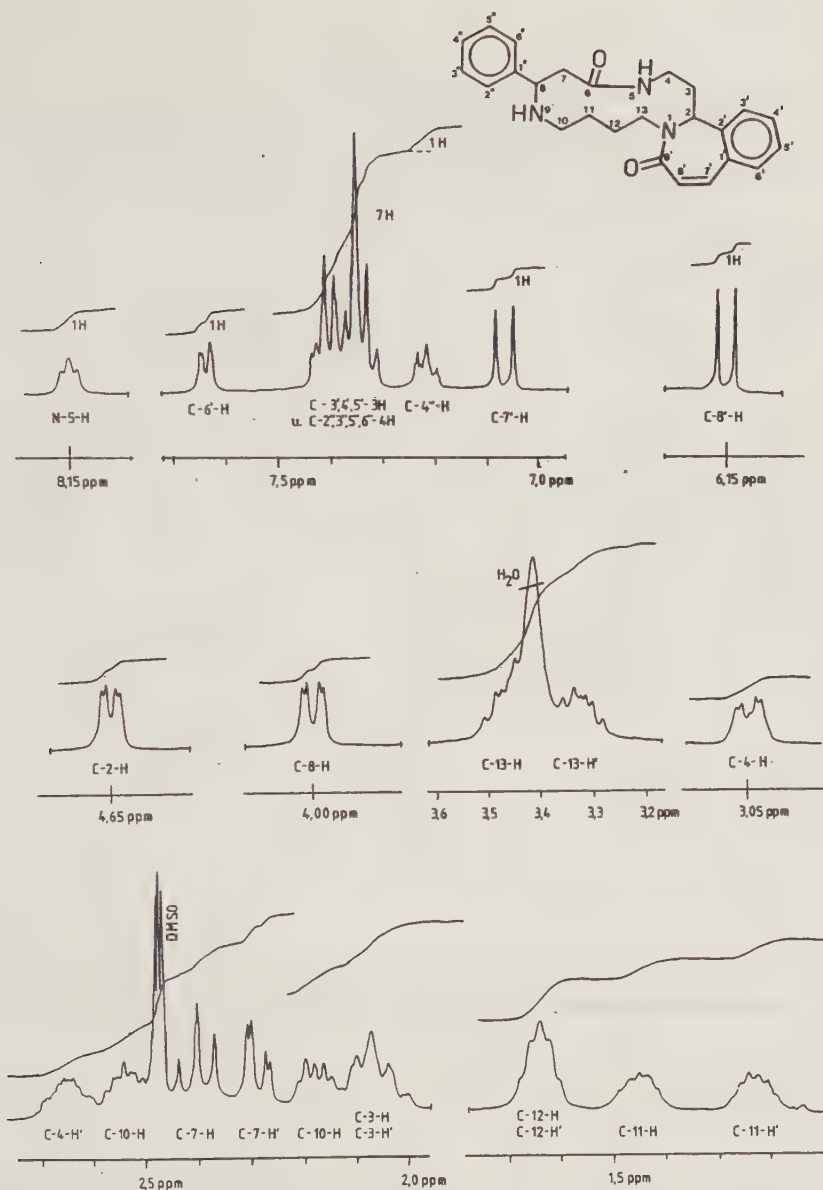


Abb. 28

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Pleurostylin (PA-I) (Spektrum 1, $\text{DMSO}-d_6$)

T a b e l l e 8

¹H-NMR-Spektraldaten von Pleurostylin (360 MHz-Spektrum 2)

(5 mg PA-I/0,4 ml; CDCl₃:DMSO-d₆ = 5:1 ; CHCl₃ = 7,25 ppm int.St.)

ppm	Spin-System	Integral (Protonen)	Kopplungen	J (Hz)
<u>13-Macrocyclus:</u>				
C-2-H	4,46	dd	1H	J _{2/3} = 10,5; J _{2/3'} = 3
C-3-H,H'	1,92-2,10	m	2H	J _{3/2} = 10,5; J _{3'/2} = 3
C-4-H	3,00	m	1H	J _{4/4'} = 14; J _{4/5} = 4,5; J _{4/3} = J _{4/3'} = 3,5
C-4-H'	2,58	m	1H	J _{4/4'} = 14; J _{4'/5} = 6; von H ₂ O-Signal überl.
N-5-H(Amid)	7,51	br.t	1H	J _{5/4} = 4,5; J _{5/4'} = 6,5
C-7-H	2,31	t(dd)	1H	J _{7/7'} = 13; J _{7/8} = 11
C-7-H'	2,25	dd	1H	J _{7'/7} = 13; J _{7'/8} = 4
C-8-H	3,85	dd	1H	J _{8/7'} = 4; J _{8/7} = 11
N-9-H(Amin)	1,9-2,8	vermutlich		
C-10-H	2,44	ddd	1H	J _{10/10'} = 13; J _{10/11} = 8,5 J _{10/11'} = 5,5
C-10-H'	2,15	m("q")	1H	J _{10'/10} = 13; J _{10'/11} = 4; J _{10'/11'} = 6
C-11-H	1,38	m	1H	J _{10/11} = 8,5; J _{10'/11} = 4
C-11-H'	1,08	m	1H	J _{10/11'} = 5,5; J _{10'/11'} = 6
C-12-H,H'	1,58	m	2H	
C-13-H	3,45	td(ddd)	1H	J _{13/13'} = 13 ; J _{13/12} = 11,5 J _{13/12'} = 6
C-13-H'	3,14	td(ddd)	1H	J _{13/13'} = 13; J _{13'/12} = 4; J _{13'/12'} = 12
<u>ortho-substituierter cis-Cinnamoylrest an N-1 und Phenylrest am C-8:</u>				
C-6'-H	7,37	"t"	1H	
C-3',4',5-3H und C-2'',3'', 4'',5'',6''-5H	7,00- 7,18	m	8H	
C-7'-H	6,75	d	1H	J _{7'/8'} = 12
C-8'-H	6,01	d	1H	J _{7'/8'} = 12

Die Zuordnung erfolgte auf Grund von 10 Entkopplungsexperimenten.
Die Kopplungskonstanten sind angenäherte Werte.

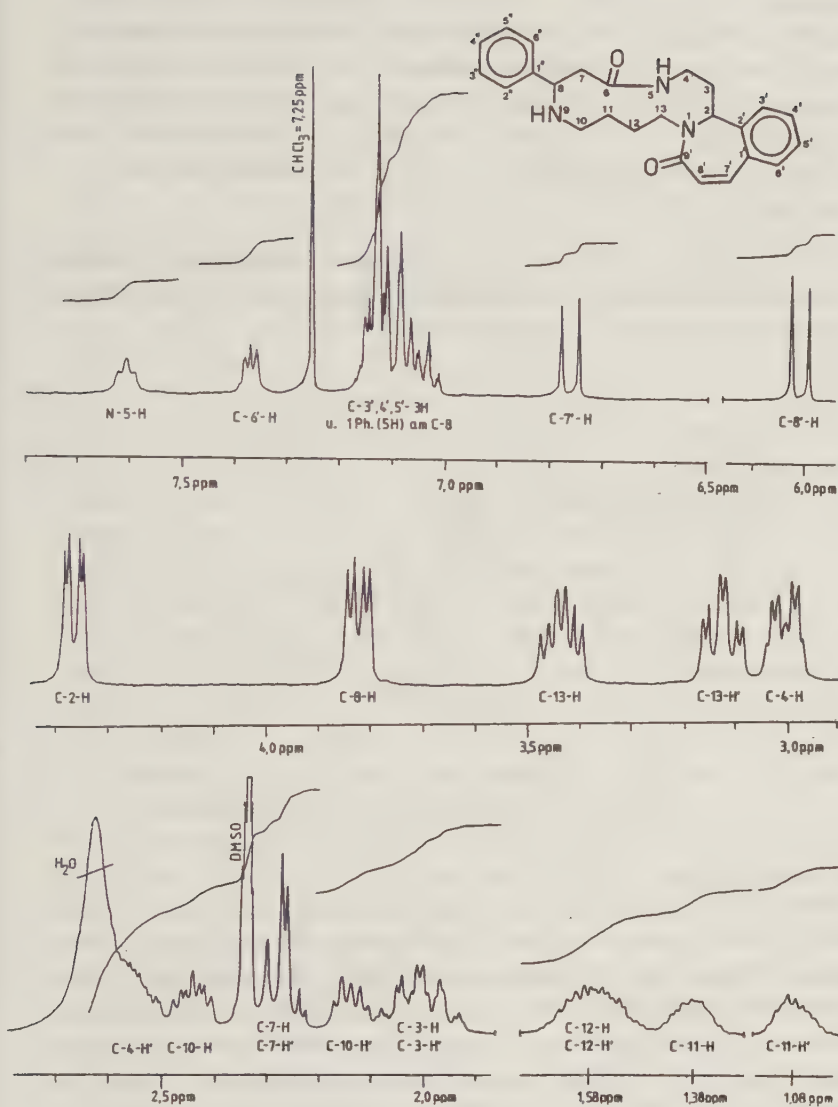


Abb. 29

360 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Pleurostylin (PA-I)
(Spektrum 2, CDCl₃-DMSO-d₆ = 5:1)

ermittelt werden, wobei die Spinsysteme erwartungsgemäß komplex sind (s. Abb. 28 und 29 bzw. Tab. 7 u. 8). Lediglich die Protonen am C-7 und C-8 bilden ein interpretierbares AMX-System. So vereinfachen sich bei Entkopplung des Doppeldubletts (C-8-H) bei $\delta = 4,0$ ppm die beiden Doppeldublette bei $\delta = 2,29$ und $2,42$ ppm zu je einem Dublett mit einer geminalen Kopplungskonstante von 13 Hz (360 MHz-Spektrum 1).

Mit Pleurostylin (PA-I) wurde erstmalig ein macrocyclisches Spermidinalkaloid mit C-C-Verknüpfung innerhalb der Spermidinkette in seiner Struktur aufgeklärt.

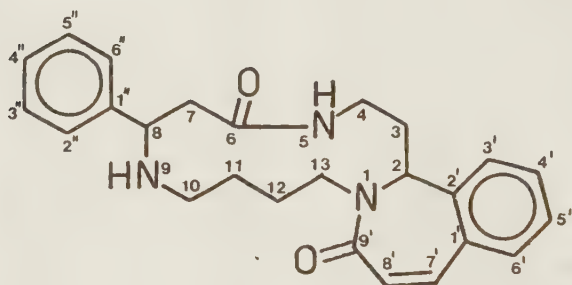


Abb. 30

Struktur von Pleurostylin (PA-I)

9.4. Zur Stereochemie von Pleurostylin

Über die Konformation von 13-gliedrigen Ringsystemen weiß man nach DALE wenig Konkretes, da eine Vielzahl von möglichen Konformationen miteinander konkurrieren kann (91). Das Dreiding-Molekülmodell zeigt die außerordentliche Flexibilität des 13-gliedrigen Lactamringes, die an eine offenkettige Verbindung erinnert. Lediglich über die Amidgruppe am C-6 ist eine Teilaussage möglich, da nach PAULING die Säureamidgruppe partiellen Doppelbindungscharakter besitzt (77) und cis-trans-Isomerie zeigt. Nach HUISGEN muß die Amidbindung zwischen C-6 und N-5 auf Grund der Ringgröße (>9) der trans-Konfiguration zugeordnet werden (81),

d.h. der Sauerstoff am C-6 steht in trans-Stellung zum Amidproton am N-5. Umgekehrt verhält es sich im Falle des 7-gliedrigen Lactamrings am N-1. Hier erfordert die Ringgröße (<9) eine cis-Konfiguration des Cinnamoylamids, d.h. das Brückenkopfatom C-2 steht cis zu C-8' und trans zum Carbonylsauerstoff an C-9'. Durch den Einbau in ein Ringsystem muß auch die olefinische Gruppe der Zimtsäure zwangsläufig cis-orientiert sein. Dies ist der Grund, warum die cis-Zimtsäure in Pleurostylin beim Bestrahlen mit UV-Licht nicht isomerisiert, da hierzu eine Öffnung des Ringsystems notwendig gewesen wäre. Die Doppelbindungen am C-1' und C-7', sowie die Amidbindung zwischen C-9' und N-1 zeigen keine freie Drehbarkeit und bewirken, daß der 7-Lactamring äußerst starr ist. Er liegt in einer Boot-Konformation vor, wobei lediglich das C-2-Brückenkopfatom umklappen kann. In einem Fall liegt dabei das benzyliche Proton am C-2 in der Ebene des ortho-substituierten Cinnamoylrestes und wird durch den Ringstromeffekt des Aromaten entschirmt. Im anderen Fall steht das Proton am C-2 nahezu senkrecht zur Ringebene des Aromaten, wird stärker abgeschirmt und müßte daher bei höherem Feld erscheinen. Im Astrocasin, einem Dipiperidin-Alkaloid aus *Astrocasia* phyllantoides liegt ebenfalls ein derartiges 7-Lactamringsystem vor (92). Im kristallinen Zustand des Astrocasin-Methobromids wurde durch Röntgenstrukturanalyse das benzyliche Proton in der axialen Stellung zur Aromatenebene gefunden (93). Nach LLOYD erscheint das Benzylamidoproton in einem Derivat von Astrocasin als breites Triplett bei etwa 4,8 ppm. Für Astrocasin selbst macht er keine Angaben (92). Wir selbst haben bei Astrocasin* ein Doppeldublett bei 4,35 ppm (360 MHz, DMSO-d₆ = 2,49 ppm int. St.) bzw. ein Triplett bei 4,50 ppm (60 MHz, CDCl₃, TMS int. St.) gefunden. Unsere Werte für Pleurostylin liegen entsprechend. Bedenkt man, daß das Benzylamidoproton C-8-H im Acetyl-Pleurostylin bei 5,6 ppm erscheint, so spricht dies für die Annahme, daß in Pleurostylin und in Astrocasin der starre 7-Lactamring auch in Lösung in der Boot-Konformation vorliegt, wobei das Proton am C-2 nahezu senkrecht zur Ringebe-
ne des disubstituierten Benzolrings steht und entsprechend ab-
geschirmt ist.

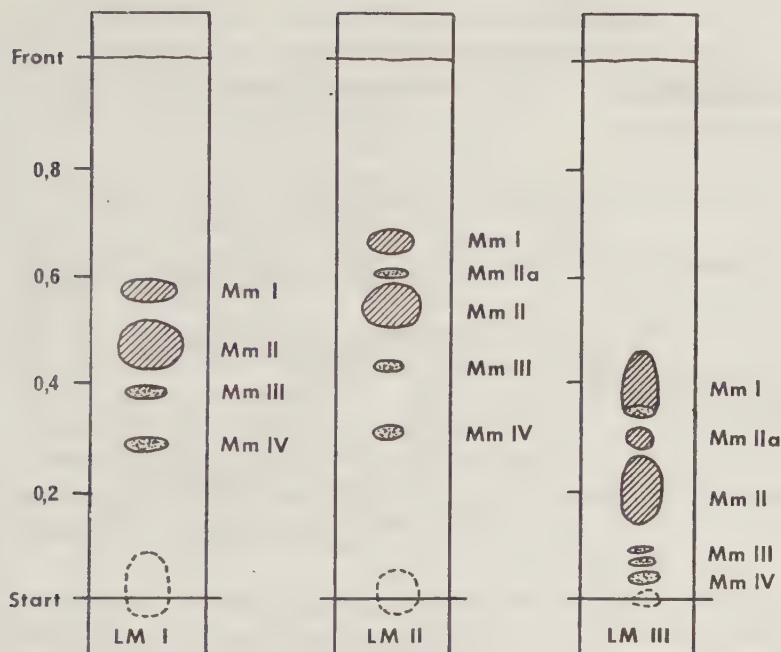
*Astrocasin wurde von Dr. H.A. LLOYD, National Institut of Health, Bethesda, Maryland-USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

10.0 Isolierung von Alkaloiden aus *Maytenus mossambicensis*

Das DC-Verhalten des Alkaloidgemisches von *Maytenus mossambicensis* ließ vermuten, daß es sich um ähnliche Alkaloide wie bei *Pleurostyliia africana* und *Maytenus heterophylla* handeln könnte.

Im Laufmittel I (Chloroform - Methanol = 90:10) wurden zunächst vier Dragendorff-positive Verbindungen festgestellt. Von diesen dominierten mengenmäßig Mm-II vor Mm-I. Sie ließen sich ohne weitere Anreicherung direkt aus dem äthanolischen Extrakt nachweisen. Bei Verwendung von Dichlormethan-Methanol = 92:8 als Laufmittel, wurde zwischen Mm-I und Mm-II noch ein weiteres Nebenalkaloid detektiert (Mm-IIa, s. Abb. 31).

Im Hauptisolierungsgang (s. Abb. 32) wurde zunächst ein alkaloidfreier Petrolätherextrakt hergestellt und der Drogenrückstand anschließend mit Äthanol extrahiert. Der auf Sirupdicke eingeeengte Äthanolextrakt wurde mit einer 5%igen Weinsäurelösung behandelt und die saure Lösung anschließend mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Neutralisieren der Weinsäurephasen wurden die Alkaloidbasen erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt. Nach den vorausgegangenen Extraktionsversuchen war zwar keine optimale Ätherlöslichkeit der Alkaloidbasen zu erwarten, doch konnte ohne größere Emulsionsprobleme aufgearbeitet werden. Das Rohalkaloidgemisch aus Blattdroge und Zweigstücken zeigte chromatographisch das gleiche Alkaloidmuster. Die weitere Auftrennung der Alkaloide erfolgte durch Kombination von konventioneller, offener Säulenchromatographie und präparativer HPLC.



LM I : Chloroform - Methanol (90 : 10)

LM II : Dichlormethan - Methanol (92 : 8)

LM III : Dichlormethan - Isopropanol (92 : 8)

Sprühreagenz:  Essigsaurer Dragendorff

 Nachbesprüht mit 10% Natriumnitrit-Lösung

Abb. 31

Vergleichende Dünnschichtchromatographie des Rohalkaloidgemisches von *Maytenus mossambicensis* in drei Laufmittelsystemen

Isolierungsgang bei Maytenus mossambicensis

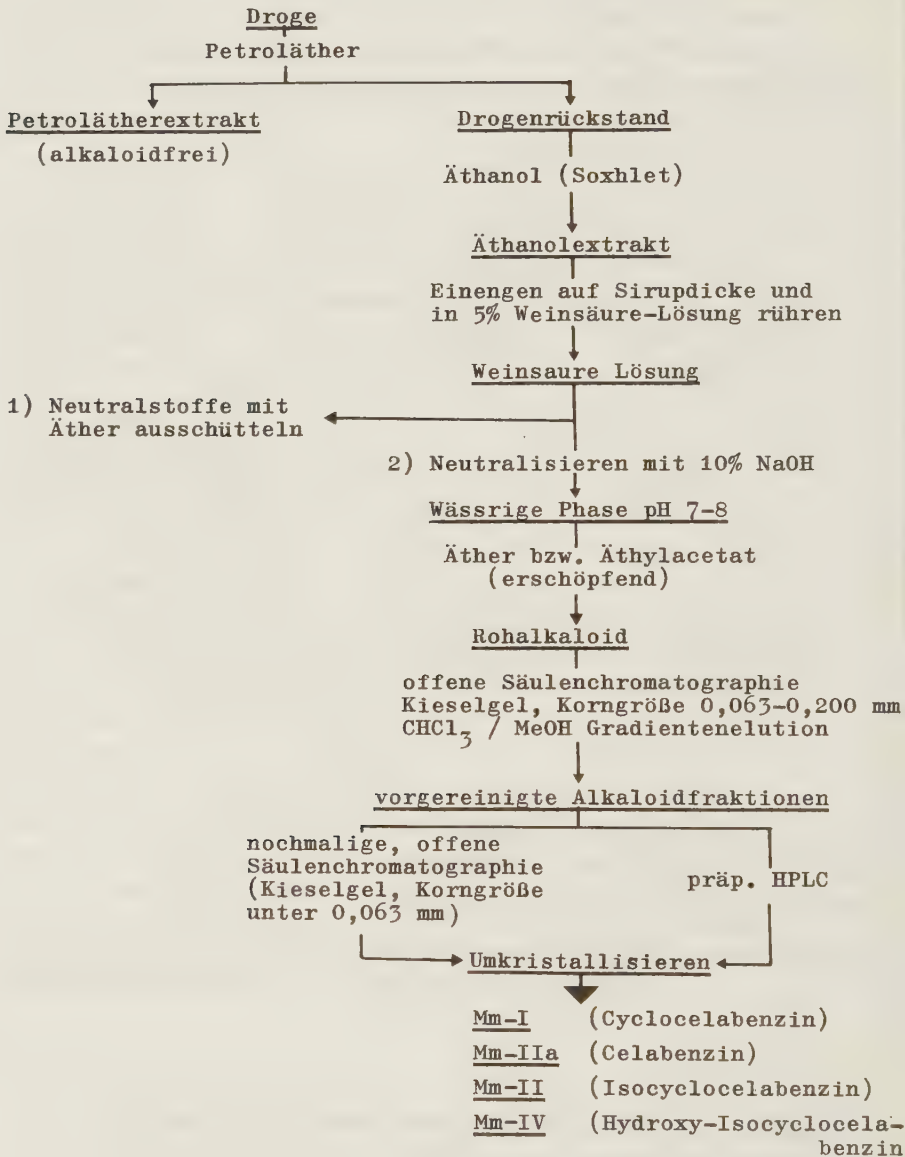


Abb. 32

Auftrennung des Rohalkaloidgemisches durch offene Säulen-
chromatographie und präparative HPLC

Das Rohalkaloidgemisch wurde in vier Portionen über offene Kieselgelsäulen mittels einer Chloroform-Methanol-Gradientenelution aufgetrennt. Nach ihrem DC-Verhalten wurden die Fraktionen folgendermaßen zusammengefaßt:

Vereinigte Alkaloidfraktionen aus Säule I - IV

Mm-I	(fast rein)	0,295 g
Mm-I/II	(neben etwas Mm IIa und weiteren Verbindungen)	3,053 g
Mm-II	(fast rein)	1,538 g
Mm-II	(angereichert, etwas Mm III)	1,187 g
Mm-III	(mit Mm II und weiteren Verbindungen)	0,175 g
Mm-IV	(angereichert)	0,606 g

Gesamtausbeute an Alkaloidfraktionen 6,854 g

Das Hauptalkaloid Mm-II konnte daraus bereits durch Umkristallisieren gewonnen werden.

Die weitere Trennung und Anreicherung von Einzelalkaloiden erfolgte durch präparative HPLC. Hierzu mußten erst die Trennbedingungen mit Hilfe der analytischen HPLC optimiert werden (94). Dabei konnten die Erfahrungen aus der DC und der offenen Säulenchromatographie erfolgreich verwertet werden. Für die analytische HPLC ergab eine Mischung von Dichlormethan - Methanol (30 + 1 bzw. 97:3) eine brauchbare Trennung (s. Abb.33). Für die Übertragung auf die präparative HPLC erhöhten wir den Methanolanteil um 3% (30 + 2 bzw. 94 : 6), da mit einer höheren Aktivität der dabei verwendeten Kieselgelcartuschen zu rechnen war. Die Fraktionierung erfolgte in Groß-Fractionen zu 100-1000 ml mit Hilfe eines Refraktometers. Nachteilig war, daß mit diesem Refraktometer Nebenalkaloide und Verunreinigungen mit geringer Konzentration neben den Hauptalkaloiden Mm-I und Mm-II nicht mehr sicher detektiert werden konnten. Ein Versuch, Rohalkaloidgemisch direkt über präp. HPLC zu trennen, ergab, daß eine Vorreinigung z.B. durch offene Säulenchromatographie sinnvoll ist. Die Kieselgelcartou-

Vergleich der analytischen HPLC von Gesamtprobe (A) und Teil-
fraktion 9 ((B) = Anreicherung von Alkaloid Mm-IIa) aus der
präparativen HPLC von Maytenus mossambicensis

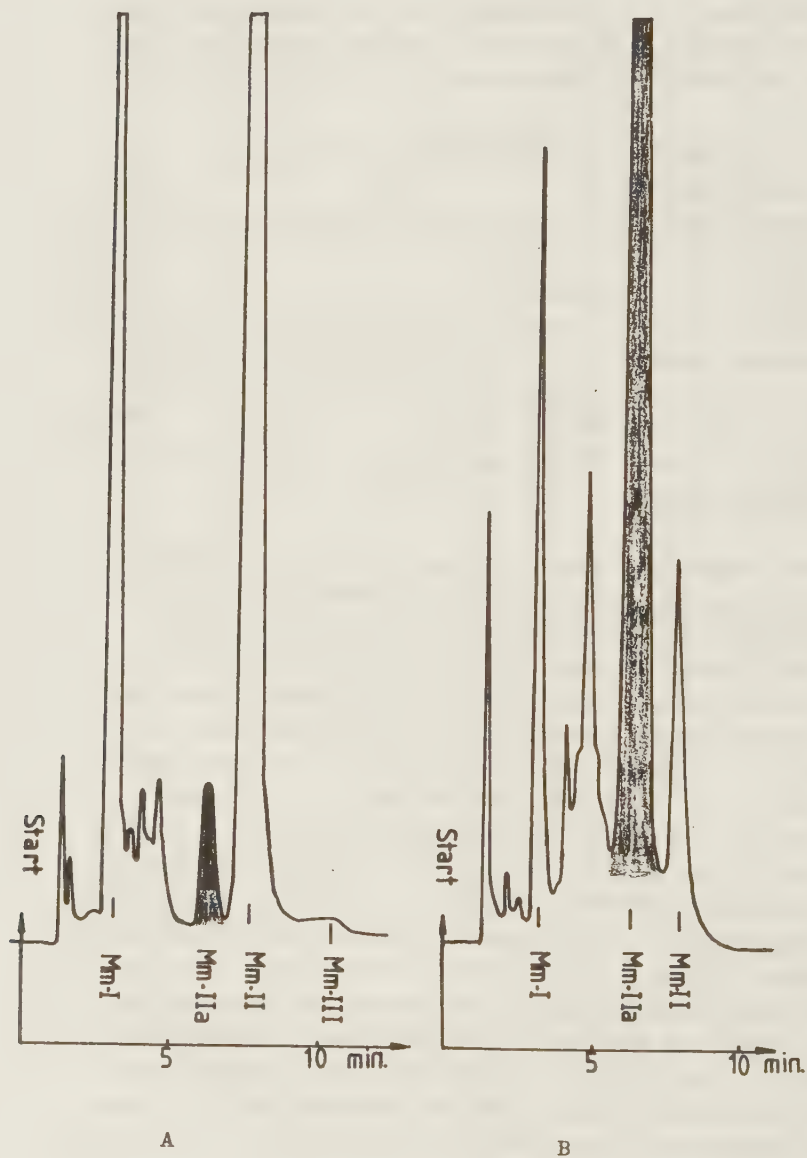


Abb. 33

schen verklebten schnell durch harzartige Verunreinigungen. Bei Trennzeiten von ca. 20 Minuten konnten insgesamt 56 mg Mm-I und 936 Mm-II reinst erhalten werden. Darüber hinaus wurden relative Anreicherungen für Einzelalkaloide erzielt.

Mit Dichlormethan-Isopropanol = 94:6 konnten schließlich auch Mm-IIa und Mm-I in größerer Menge und Reinheit erhalten werden. Es wurden allerdings längere Trennzeiten von ca. 1 Stunde benötigt. Abbildung 33 S. 68 zeigt die starke Anreicherung von Nebenalkaloid Mm-IIa in der neunten Teilfraktion der präparativen HPLC. DC und analytische HPLC gaben außerdem Hinweise auf weitere Spurenalkaloide mit positiver Dragendorff-Natriumnitrit-Reaktion. Ob es sich dabei um Artefakte oder um genuine Alkaloide handelt, die erst durch die starke Anreicherung nachweisbar wurden, bleibt offen.

Die Isolierung von chromatographisch reinem Mm-IV gelang durch konventionelle offene Säulenchromatographie mit besonders feinem Kieselgel (Merck, Korngröße unter 0,063 mm) und Chloroform-Methanol-Gradientenelution.

Insgesamt konnten aus *Maytenus mossambicensis* vier Alkaloide isoliert werden. Von ihnen ließ sich nur das Hauptalkaloid Mm-II gut kristallisieren.

Mm-I	Smp.: amorph, 180-183°C	$[\alpha]_D^{25} = +30,2^\circ$
Mm-II	Smp.: Nadeln, 227-228°C	$[\alpha]_D^{25} = +138,9^\circ$
Mm-IIa	Smp.: amorph, 165-168°C	$[\alpha]_D^{25} = \pm 0^\circ$
Mm-IV	Smp.: amorph, ca. 135°C	$[\alpha]_D^{25} = +113,1^\circ$

11.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-I (Cyclocelabenzin)

Aus der CH-Analyse und dem Massenspektrum ($M^+ = 377$) ergaben sich für Mm-I als Summenformel $C_{25}H_{27}N_3O_2$. Demnach könnte auch hier ein Spermidinalkaloid vorliegen. Mm-I besitzt wie Celacinnin 12 Doppelbindungsäquivalente, ist allerdings um eine C_2H_4 -Einheit ärmer. Mit Pyridin/Eisessig erhielt man eine Monoacetylverbindung, $C_{25}H_{29}N_3O_3$. Die optische Drehung von Mm-I beträgt $[\alpha]_D^{25} = +30,2^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0,83$), die von Mm-I-Acetat $[\alpha]_D^{22} = +22,1^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 0,36$).

Nach dem UV-Spektrum war mit Sicherheit ein Zimtsäurechromophor auszuschließen. Die Schultern bei λ_{max} 253 ($\epsilon = 5.600$) und 263 nm ($\epsilon = 4.500$), sowie die Endabsorption bei ca. 230 nm deuteten eher auf ein substituiertes Benzol (84).

Das IR-Spektrum von Mm-I zeigte eine auffällige Ähnlichkeit mit den IR-Spektren der Spermidinalkaloide aus *Maytenus heterophylla* und *Pleurostylia africana*. So ließen mehrere Banden zwischen 1450 und 1650 cm^{-1} und zwei Banden bei 695 und 750 cm^{-1} auf ein aromatisches System schließen. Bei 2920 cm^{-1} zeigten sich die CH-Streckschwingungen gesättigter Kohlenwasserstoffe. Auffällig ist eine breite Carbonylbande bei 1640 cm^{-1} (Amidbande I). Da außerdem die NH-Schwingung bei 3330 cm^{-1} auch im Acetylderivat vorhanden ist, sollte Mm-I entweder ein offenkettiges Amid oder ein macrocyclisches Lactamgerüst enthalten (81).

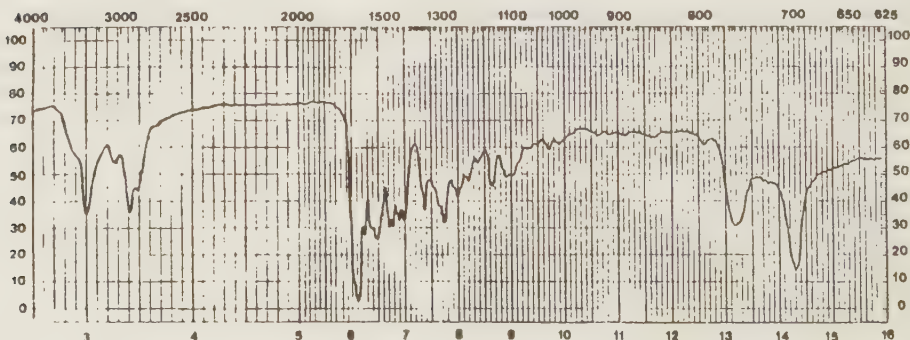


Abb. 34

IR-Spektrum (KBr) von Mm-I (Cyclocelabenzin)

Die Massenspektren von Mm-I und Mm-I-Acetat ließen eine Reihe von Parallelen zu den Spermidinalkaloiden vom Celacinnintyp erkennen. So deutete das intensivste Fragment m/e 146 (C_9H_8NO) im MS von Mm-I auf ein Zimtsäureamidbruchstück, das in der üblichen Weise weiterfragmentiert. Dies geht aus den Signalen mittlerer Intensität bei m/e 131 (C_9H_7O), m/e 103 (C_8H_7), m/e 91 (C_7H_7) und m/e 77 (C_6H_5) hervor. Da im UV- und NMR-Spektrum keine Zimtsäure nachgewiesen werden konnte, muß diese erst beim Zerfall im Massenspektrometer aus einer ringgebundenen Vorstufe entstehen. Deshalb ist die Intensität des Zimtsäurebruchstücks ($C_9H_7O = m/e$ 131,052) in Analogie zu Dihydrocelacinnin und Pleurostylin im Acetylderivat deutlich erhöht. Da im NMR-Spektrum nur 9 aromatische Protonen nachzuweisen sind, kann maximal ein monosubstituierter Benzolring vorhanden sein. Daher kommt dem Fragment m/e 160 erhebliche Bedeutung zu. Die Hochauflösung bei Mm-I-Acetat zeigte zwei Fragmente mittlerer Intensität, m/e 160,076 ($C_{10}H_{10}NO$) und m/e 160,112 ($C_{11}H_{14}N$).

$C_{10}H_{10}NO$ könnte als Zimtsäureamid, das um eine CH_2 -Einheit verlängert ist, gedeutet werden. Das $C_{11}H_{14}N$ -Bruchstück wurde bereits im hochaufgelösten MS von Pleurostylin (PA-I, s.S.52) und im MS weiterer Spermidinalkaloide vom Celacinnintyp nachgewiesen. Nach KUPCHAN entsteht dieses Ion durch Spaltung der Bindung zwischen C-7 und C-8, sowie N-1 und C-13 und Wasserstoffübertragung (41,42). Demnach könnte für Mm-I eine intakte Aminobutan-einheit und eine β -Phenylalaninstruktur der ringverknüpften Zimtsäure angenommen werden. Ein weiteres Argument dafür sind die Fragmente C_4H_8N (m/e 70,066) und $C_6H_{10}NO$ (m/e 112,076) im MS von Mm-I-Acetat. Das Signal bei m/e 305 könnte ebenfalls in Analogie zu Celacinnin durch Abspaltung einer C_3H_6NO -Einheit aus dem Molekulation (M^+ - m/e 72) entstanden sein. Diese Fragmentierung wird von KUPCHAN durch Spaltung der Bindung zwischen C-7 und C-8 sowie zwischen C-3 und C-4 verbunden mit Wasserstoffübertragung erklärt (41).

Das für Celacinnin und seine Derivate charakteristische Fragment bei m/e 274 fehlte bei Mm-I. Auch die Peaktriade m/e 143, 157 und 169, die für triacylierte Spermidinderivate als charakteristisch gilt (vgl. Abb. 13 S. 27), ist im MS von Mm-I-Acetat nicht vorhanden. Ein derartiges Verhalten wurde bereits bei

Pleurostylin beobachtet, in dem eine der sieben CH_2 -Gruppen der Spermidinkette eine C-C-Verknüpfung aufweist. Das massenspektroskopische Verhalten und die Zahl der Doppelbindungsäquivalente führten zu dem Schluß, daß Mm-I ebenfalls eine derartige C-C-Verknüpfung besitzen mußte.

Im ^1H -NMR-Spektrum von Mm-I-Acetat erscheint bei 5,5 ppm das Signal für 1 Proton, und zwar bei Raumtemperatur als verbreitertes Triplet und bei 120°C als Doppeldublett. Dieses Signal für das benzyllische C-8-H in Nachbarstellung zum acetylierten Stickstoff bestätigte die aus dem Massenspektrum abgeleitete β -Phenylalanin-Teilstruktur (41). Die Methylgruppe des Acetats erscheint als Singulett bei 2,05 ppm. Das Amidproton des Mm-I-Acetats liegt mit ca. 8,3 ppm nicht bei so ungewöhnlich tiefem Feld wie bei Mm-I. Von den 9 aromatischen Protonen befinden sich acht im Bereich von 7,2 bis 7,7 ppm, ein weiteres bei ca. 8,0 ppm. Es sollte daher eine aromatisch-aliphatische C-C-Verknüpfung vorliegen. Das einzelne Proton bei $\delta = 8$ ppm ließ auf ein ortho-substituiertes Benzoesäurederivat schließen. Dies zeigte der Vergleich mit NMR-Spektren von ortho-Methylbenzoesäure und Benzoesäureamid (95).

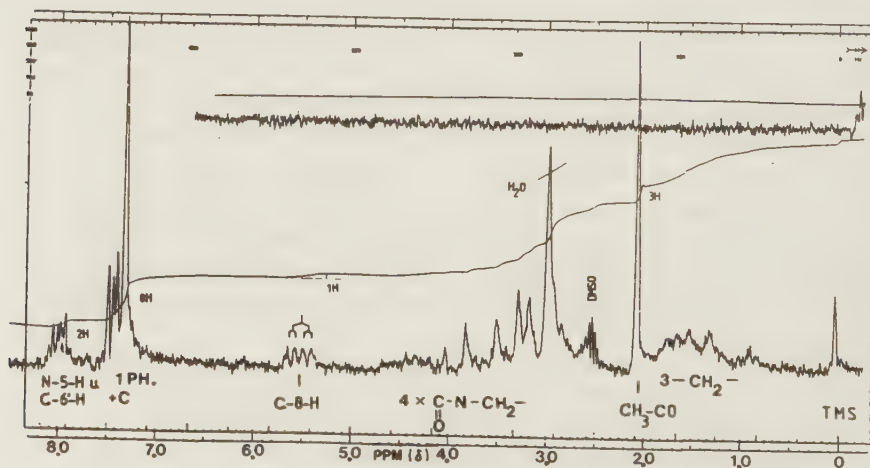


Abb. 35

^1H -NMR-Spektrum von Acetylcycloclabenzin (Mm-I-Acetat)
(60 MHz, DMSO-d_6 , 120°C , TMS int.St.)

Tabelle 9a: $^1\text{H-NMR}$ -Spektraldaten von Cyclocelabenzin (Mm-I)
(200 MHz, CDCl_3 , TMS int.)

ppm	Spin- system	Integral	Kopplungen,	J (Hz)
<u>Phenylrest am C-8</u>				
C-2''-H C-6''-H	7,11	m	2 H	
C-3''-H C-4''-H C-5''-H	im Bereich m 7,15-7,35	3 H	(z.Tl. überlagert mit C-3'-H)	
<u>Ortho-substituiertes Benzoesäureamid am N-1:</u>				
C-3'-H	7,37	dd	Signale überlagert (3H)	$J_{\text{ortho}} = 7-7,5 \text{ Hz}$
C-4'-H	7,50	td		$J_{\text{meta}} = 1,5 \text{ Hz}$
C-5'-H	7,42	td		
C-6'-H	8,16	dd	1 H	

Die Zuordnung im aromatischen Bereich erfolgte durch Vergleich mit dem 360 MHz- $^1\text{H-NMR}$ von Isocyclocelabenzin (Mm-II)

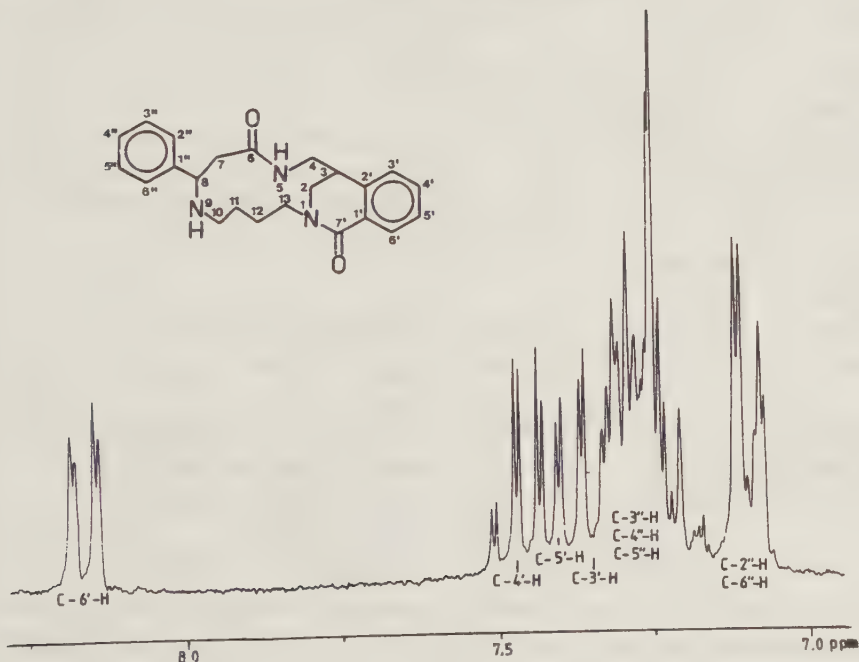


Abb. 36a

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclocelabenzin (Mm-I): Aromatischer Teilbereich
(CDCl_3 , 200 MHz, TMS int.)

T a b e l l e 9 b

¹H-NMR-Spektraldaten von Cycloelabenzin (Mm-I)

(200 MHz, CDCl₃, TMS int.)

	ppm	Spin- system	Kopplungen: J (Hz)
<u>13-Macrocyclus:</u>			
C-2-H	3,87	dd	$J_{2/2'} = 13$; $J_{2/3} = 5,5$
C-2-H'	3,61	dd	$J_{2'/2} = 13$; $J_{2'/3} = 1,5$
C-3-H	3,20	m	$J_{2/3} = 5,5$; $J_{2'/3} = 1,5$
			$J_{3/4} = 5,5$; $J_{3/4'} = 2,5$
C-4-H	4,17	m (ddd)	$J_{4/4'} = 14$; $J_{3/4} = 5,5$; $J_{4/5} = 9$
C-4-H'	3,38	dt (ddd)	$J_{4'/4} (= J_{4'/3}) = 2,5$; $J_{4'/5} = 3$
N-5-H (Amid)	9,54	br.d (dd)	$J_{5/4} = 9$; $J_{5'/4} = 3$
C-7-H	2,40	dd	$J_{7/8} = 11$; $J_{7/7'} = 17$
C-7-H'	2,22	dd	$J_{7'/8} = 3$; $J_{7'/7} = 17$
C-8-H	3,56	dd	z.Tl. überlagert v. C-2-H' $J_{7/8} = 11$; $J_{7'/8} = 3$
N-9-H (Amin)	im Bereich 1,2-2,2		
C-10-H	2,7-2,9	m (ddd)	überlagert von C-13-H'
C-10-H'	2,4-2,6	m (ddd)	$J_{10/10'} = 12,5$; $J_{10'/11} = 3,5$ $J_{10'/11'} = 6$
C-11-H, H'	1,3-1,9	kompl. m	C-11-H, H' und C-12-H, H' über-
C-12-H, H'	1,5-2,1	kompl. m	lagern sich zum Teil
C-13-H	4,46	ddd	$J_{13/13'} = 14$; $J_{12/13} = 9$; $J_{12'/13'} = 2$
C-13-H'	2,7-2,9	m (ddd)	überlagert von C-10-H

Die Zuordnung erfolgte auf Grund von 9 Entkopplungsexperimenten
Die Kopplungsgrößen sind angenäherte Werte.

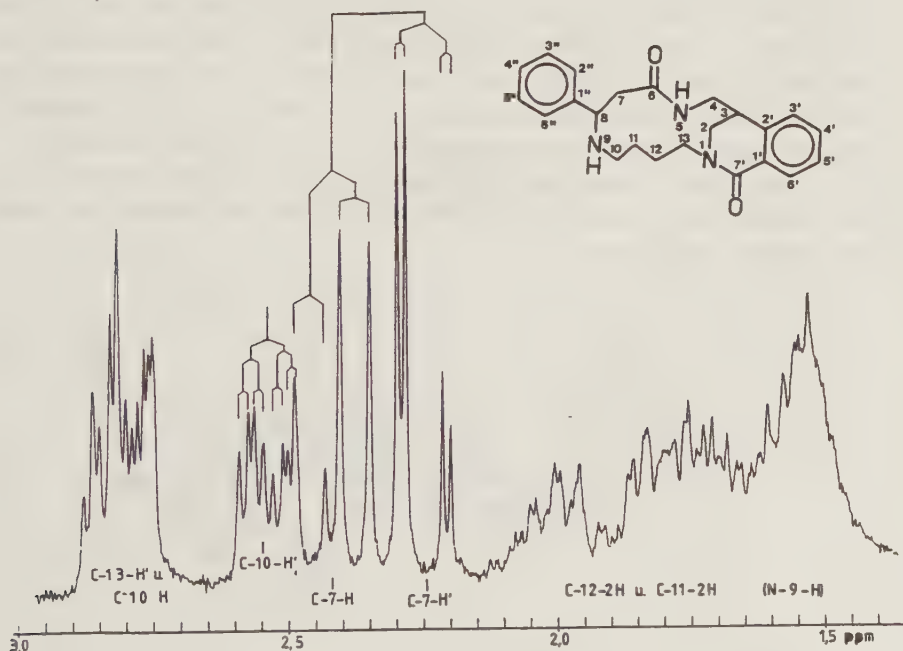
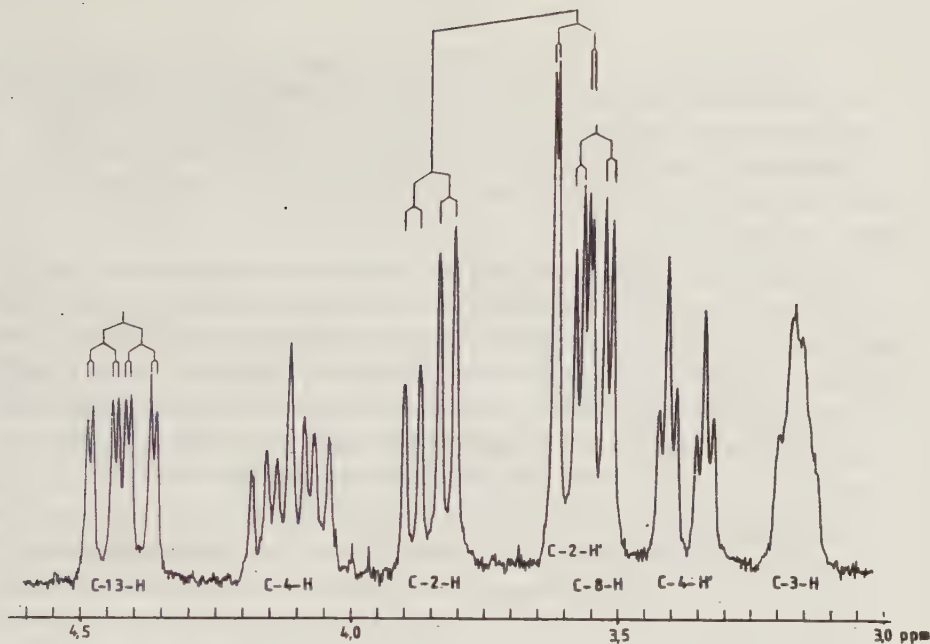


Abb. 36b

200 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Cyclocelabenzin (Mm-I): Aliphatischer Teilbereich 1,4-3,0 ppm bzw. 3,0-4,6 ppm (CDCl_3 , Raumtemperatur, TMS int.)

Noch deutlicher ist dies im 200 MHz-Spektrum von Mm-I zu sehen. Hier erscheint bei 8,16 ppm ein klares Doppeldublett für das Proton in ortho-Position. Auch die Signale der übrigen Benzoylprotonen ergeben ein Spektrum erster Ordnung (s. Abb. 36a und Tab. 9a).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß Mm-I ein macrocyclisches Grundgerüst vom Celacinnintyp besitzen muß. An Stelle eines Cinnamoylrestes am N-1 liegt ein Benzoylrest vor. Dieser muß wiederum in ortho-Position mit dem Macrocyclus innerhalb der N-(CH₂)₃-N-Einheit verknüpft sein. Die genaue Lage des aliphatischen Brückenkopfatoms und damit die Struktur von Mm-I können gleichermaßen aus dem ¹³C-NMR und dem 200 MHz-¹H-NMR abgeleitet werden.

Im 200 MHz-¹H-NMR erscheinen im Bereich von 3-4,5 ppm Signale von 7 Protonen (s. Abb. 36). Durch Entkoppeln des Amidprotons bei 9,54 ppm treten Veränderungen der Signale bei 4,17 und 3,38 ppm auf. Das C-4-Atom in Nachbarschaft zum Amidstickstoff N-5 besitzt demnach 2 nicht äquivalente Protonen C-4-H und C-4-H' und kann daher nicht Ort der Verbrückung sein. In beiden Fällen ist das beim Entkopplungsexperiment entstandene Spinsystem ein Doppeldublett mit einer geminalen Kopplung von $J_{4/4'} = 14$ Hz und jeweils einer vicinalen Kopplung von $J_{3/4} = 5,5$ Hz bzw. $J_{3/4'} = 2,5$ Hz. Somit trägt das benachbarte C-3-Atom nur 1 Proton und muß die gesuchte Verknüpfungsstelle mit dem Phenylrest des Benzoessäureamids sein.

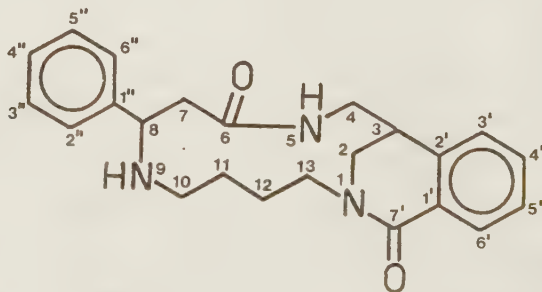


Abb. 37

Struktur von Cyclocelabenzin (Mm-I)

Weder Entkopplung von C-4-H bei $\delta = 4,17$ ppm, noch von C-4-H' bei $\delta = 3,38$ ppm machten eine sichere Zuordnung von C-3-H möglich. Erst Entkoppeln des Protons bei 3,20 ppm zeigte deutlich, daß es sich dabei um das Proton der Verbrückungsstelle handelt. Bei diesem Doppelresonanzexperiment ergeben die beiden Protonen am benachbarten C-4 je ein Doppeldublett und die beiden Protonen am benachbarten C-2 bei $\delta = 3,87$ und $\delta = 3,61$ ppm je ein Dublett mit $J_{\text{gem}} = 13$ Hz. In ähnlicher Weise ließen sich auch die übrigen Protonen zuordnen (s. Tabelle 9) und damit die Struktur von Mm-I (Cyclocelabenzin, s. Abb. 37) bestätigen. Auffällig ist dabei, daß das benzyliche Proton am C-8-H bei 3,56 ppm und nicht bei 4,0 ppm wie bei den zum Vergleich herangezogenen Spermidinalkaloiden erscheint. Interessanterweise stellt mit $\delta = 4,46$ ppm ein Proton am C-13 das aliphatische Proton bei tiefstem Feld dar. Dagegen liegt das andere Proton am C-13 um ca. 1,7 ppm bei höherem Feld. Dieses Verhalten wirkt sich bei der Off-Resonance-Entkopplung im ^{13}C -NMR aus.

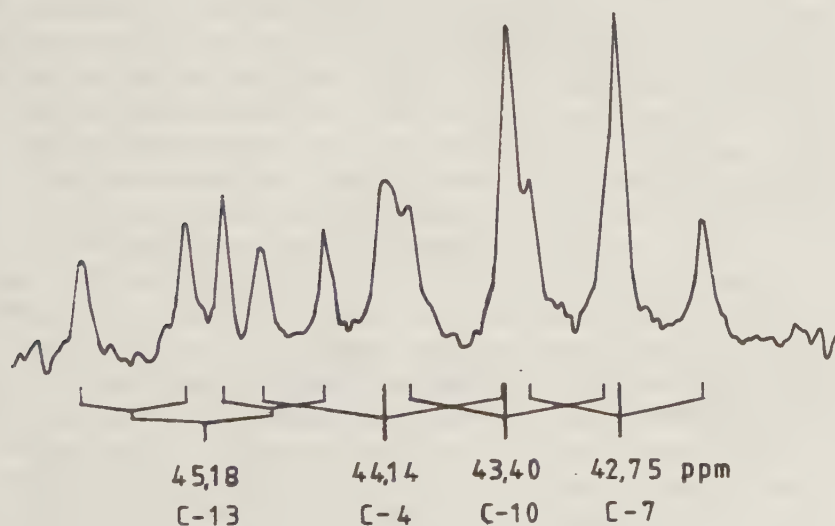


Abb. 38

Teilausschnitt aus dem Off-Resonance- ^{13}C -NMR-Spektrum von Cyclocelabenzin (Mm-I)

11.1 ¹³C-NMR von Mm-I (Cyclocelabenzin)

Normalerweise lassen sich bei Einstrahlen eines kohärenten Radiofrequenzfeldes H₂ im Bereich nahe der ¹H-NMR-Absorption (sog. "Protonen-Off-Resonance-Entkopplung") die Zahl der direkt an einen Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome erkennen. So ergeben CH₃-Gruppen ein 1:3:3:1-Quartett, CH₂-Gruppen ein 1:2:1-Triplett, CH-Gruppen ein 1:1-Dublett und nicht protonierte, quarternäre Kohlenstoffatome ein Singulett. Eine Methylen-Gruppe C-H,H' ergibt bei Off-Resonance genau genommen nur dann ein 1:2:1-Triplett, wenn $\delta(H) = \delta(H')$ ist und somit das ¹H-¹³C-Spinsystem einem A₂X-System entspricht. Sind die beiden geminalen Protonen nicht äquivalent, so wird bei Off-Resonance im ¹³C-NMR ein Dublett erhalten. Solange allerdings die Nichtäquivalenz der geminalen Protonen 0,5 ppm nicht übersteigt, wird nach HAGAMAN dieser Effekt im Spektrum nicht sichtbar (96). Denn es existiert zwar nominell ein ABX-Spinsystem, doch kommt es bei der Linienbreite des Signals, die durch "long-range"-C-H-Kopplungen hervorgerufen werden, nicht zum Tragen. Übersteigt aber die Nichtäquivalenz der geminalen Protonen deutlich 0,5 ppm, so kann für eine derartige CH₂-Gruppe in einem Off-Resonance-¹³C-NMR-Spektrum das Doppeldublett eines AMX-Systems beobachtet werden. Ein derartiges Verhalten kann als Zuordnungshilfe oder zur Konformationsanalyse verwendet werden.

Bei Mm-I (Cyclocelabenzin) unterscheiden sich die geminalen Protonen am C-4 um 0,8 ppm und am C-13 um ca. 1,7 ppm. Betrachten wir das Off-Resonance-¹³C-NMR von Mm-I (s. Abb. 39 und Tab. 10), so sehen wir deutlich bei $\delta = 59,27$ und $36,68$ ppm die Dublette zweier CH-Gruppen, entsprechend den C-Atomen C-8 und C-3. Daneben gilt es, die Signale von sieben aliphatischen CH₂-Gruppen zuzuordnen, davon allein vier im Bereich von $\delta = 41-45$ ppm. In Abb. 38 S. 77 wird dieser enge Spektralbereich in gedehnter Form wiedergegeben. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen C-4, C-7, C-10 und C-13 möglich. Das Signal bei $45,18$ ppm spaltet deutlich in ein Doppeldublett auf und kann daher nur dem C-13 entsprechen. Das Triplett bei $44,14$ ppm ist stark verbreitet und muß daher C-4 zugeordnet werden. Schwieriger ist die Unterscheidung zwischen C-7 und C-10. Da sich hier die nichtäquivalenten Methylenprotonen um weniger als 0,5 ppm in ihrer chemischen Verschiebung unterscheiden, liegen zwei "normale" Triplette bei $43,40$ und $42,75$ ppm vor. Auf Grund der größeren Restkopplung J_R sollte das Signal bei $43,40$ ppm dem C-10 entsprechen, da dessen Protonen im ¹H-NMR-Spektrum bei tieferem Feld als jene am C-7 erscheinen (87).

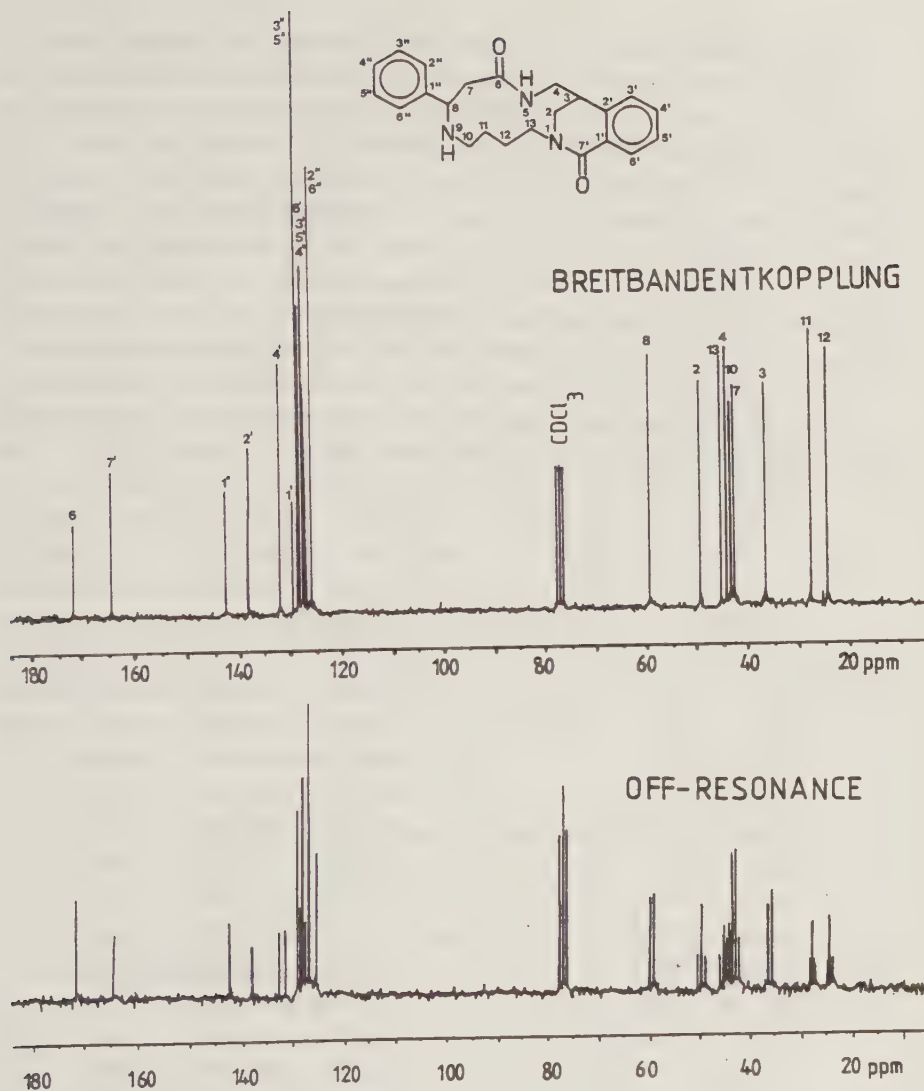


Abb. 39

^{13}C -NMR-Spektrum von Cyclocelabenzin (Mm-I)
(50,29 MHz, CDCl_3 = 77,0 ppm int. St.)

Im Prinzip kann auch im aromatischen Bereich die Größe von J_R neben der Signalmultiplizität des Off-Resonance-Spektrums als Zuordnungshilfe eingesetzt werden. Allerdings liegen von den aromatischen Kohlenstoffsignalen allein 7 Signale im Bereich von 126 - 130 ppm, so daß in einigen Fällen durch die Überlagerung von Signalen eine genaue Zuordnung nicht mehr zweifelsfrei möglich ist. Außerdem kommen in Aromaten häufig auch ^{13}C - ^1H -Kopplungen über mehr als eine Bindung vor. Vor allem Kopplungen mit metaständigen Protonen können zu Signalaufspaltungen führen (87). So erscheint bei einem genügend gespreizten Spektrum das Dublett bei 132,00 ppm deutlich mit einer zusätzlichen Aufspaltung. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Zuordnung der ^{13}C -Signale von Cyclocelabenzin (Mm-I).

T a b e l l e 10

^{13}C -NMR-Signale von Cyclocelabenzin (Mm-I)

<u>13-Macrocyclus:</u>			<u>o-subst. Benzoesäureamid:</u>		
C-2	49,50	(t)	C-1'	129,28	(s)
C-3	36,68	(d)	C-2'	138,13	(s)
C-4	44,14	(t verbr.)	C-3'	127,44 ⁺⁺	(d)
C-6	171,64	(s)	C-4'	132,00	(dd)*
C-7	42,75	(t)	C-5'	127,26 ⁺⁺	(d)
C-8	59,27	(d)	C-6'	127,94	(d)
C-10	43,40	(t)	C-7'	164,21	(s)
C-11	27,86 ⁺	(t)	<u>Phenylrest am C-8:</u>		
C-12	24,13 ⁺	(t)	C-1"	142,41	(s)
C-13	45,18	(dd)*	C-2"	126,05	(d)
			C-3"	128,57	(d)
			C-4"	127,38 ⁺⁺	(d)

+, ++: Diese Zuordnungen sind vertauschbar

* Aufspaltungen höherer Ordnung bei Protonen-Off-Resonance-Entkopplung (96). Aufnahme der 50,29 MHz-Spektren in CDCl_3 (int. St. $\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm}$) bei Raumtemperatur.

11.2 Zur Stereochemie von Cyclocelabenzin (Mm I)

Cyclocelabenzin besitzt den 13-gliedrigen Lactamring der macrocyclischen Spermidinalkaloide vom Celacinnintyp und durch die Verknüpfung am C-3 einen zusätzlichen 6-Lactamring. Auf Grund der Ringgröße ist im 13-Lactamring die planare Amidgruppe transkonfiguriert und im 6-Lactamring cis-konfiguriert (81,82). Die Fixierung des Benzoessäurecarbonyls am N-1 in cis-Stellung zu C-13 ist der Grund, daß wir in Analogie zu Pleurostylin (PA-I) und im Gegensatz zum unverbrückten Celacinnin (PA-II) im ^{13}C -NMR von Cyclocelabenzin für jeden aliphatischen Kohlenstoff bereits bei Raumtemperatur nur ein definiertes Signal bekommen. Die bereits erwähnte auffällige Nichtäquivalenz der beiden Protonen am C-13 hat seine Ursache ebenfalls in der räumlichen Lage und Nähe des Benzoessäurecarbonyls am C-7'. Nach den Untersuchungen von BOHLMANN am Chinolizidon (97) sollte das eine Proton am C-13 bei 4,46 ppm in der Ebene der Amidgruppe vom N-1 liegen, da so die Entschirmung durch die Anisotropie der Carbonylgruppe voll wirksam wird. Das andere Proton, C-13-H', steht dagegen nahezu senkrecht zur Ebene der Amidgruppe, wird entsprechend abgeschirmt und erscheint daher mit ca. 2,8 ppm bei relativ hohem Feld.

Der Ringschluß am C-3 zu einem 6-Lactamring bewirkt, daß die Flexibilität des 13-Macrocyclus im Vergleich zum unverbrückten Celacinnin oder am C-2 verbrückten Pleurostylin wesentlich eingeschränkt ist. Dadurch ist wahrscheinlich auch eine bestimmte Konformation des 13-Macrocyclus bevorzugt, ohne daß in diesem komplexen Fall eine konkrete Aussage gemacht werden kann. Einfacher ist dies im Falle des starren 6-Lactamringes, der in leicht deformierter Bootform in der Ebene des ortho-substituierten Benzoessäureamids liegt. Hier ist die freie Drehbarkeit der Einfachbindungen am C-2 und C-3 aufgehoben, lediglich ein "Durchklappen" der Methylengruppe von C-2 ist möglich. Unabhängig von der möglichen Konfiguration am asymmetrischen C-3-Atom sind daher nur zwei Konformationen des 6-Lactamrings denkbar, einmal mit äquatorialem

C-3-H und einmal mit axialem C-3-H. Die Kopplungskonstanten $J_{2/3} = 5.5$ Hz und $H_{2',/3} = 1.5$ Hz lassen sich auf Grund der Karplus-Conroy-Beziehung wesentlich besser mit einer Bootsform mit äquatorialem C-3-H vereinbaren (98,99). Denn in diesem Fall betragen die Diederwinkel zwischen den vicinalen Protonen am C-3 und C-2 ca. 40° und 80° . Im umgekehrten Falle, bei axialem C-3-H, sollten die Diederwinkel nach dem Dreidingmodell ca. 50° und 170° betragen, was sich mit den gefundenen Kopplungskonstanten schlecht vereinbaren läßt. Auch die chemische Verschiebung von C-3-H bei $\delta = 3,20$ ppm deutet darauf, daß C-3-H in der Ebene des disubstituierten Aromaten und nicht senkrecht dazu steht. Die freie Drehung der Bindung zwischen C-3 und C-4 ist stark eingeschränkt. Für das bei tiefem Feld (4,17 ppm) liegende C-4-H kann angenommen werden, daß es in der Ebene des Amids am N-5 liegt. Nur so läßt sich die hohe Kopplungskonstante $J_{4/5} = 9$ Hz und der entschirmende Einfluß durch die Anisotropie der Carbonylgruppe am C-6 erklären. C-4-H' ist entsprechend um ca. 60° aus der Ebene der planaren Amidgruppe herausgedreht. Es ist nämlich stärker abgeschirmt (3,38 ppm) und besitzt mit $J_{4',/5} = 3$ Hz eine wesentlich schwächere Kopplung mit dem Amidproton. C-3-H sollte zu den beiden Protonen am C-4 "auf Lücke" stehen, wobei die Diederwinkel von ca. 50° und 70° sich am besten mit den gefundenen Kopplungskonstanten $J_{3/4} = 5,5$ Hz und $J_{3/4'} = 2,5$ Hz vereinbaren ließen. Die Ursache, warum das Amidproton N-5-H bei ziemlich tiefem Feld kommt, könnte auf einer Wechselwirkung mit dem Phenylrest am C-8 beruhen. Allerdings sind Aussagen über die Konformation für den 13-Macrocyclus, mit Ausnahme des Bereichs des starren 6-Lactamrings, kaum möglich (91).

12.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-II (Isocyclocelabenzin)

Mm-II, das Hauptalkaloid aus *Maytenus mossambicensis*, kristallisierte in schönen Nadeln vom Schmelzpunkt $227^{\circ} - 228^{\circ}\text{C}$. Das hochaufgelöste Massenspektrum ergab in Übereinstimmung mit der CH-Analyse die Summenformel $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$. Demnach ist Mm-II mit Cyclocelabenzin (Mm-I) strukturisomer und hat gleichfalls 12 Doppelbindungsäquivalente. Mit Pyridin/Eisessig bildete es eine Monoacetylverbindung, $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$. Die optische Drehung von Mm-II betrug $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +138,9^{\circ}$ und von Mm-II-Acetat $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +221^{\circ}$.

Das UV-Spektrum hatte Schultern bei $\lambda_{\text{max}} 265 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4940$) und $\lambda_{\text{max}} 254 \text{ nm}$ ($\epsilon = 5950$) sowie Endabsorption ab 230 nm . Damit stimmt das UV-Spektrum mit dem von Cyclocelabenzin (Mm-I) nahezu vollkommen überein.

Das IR-Spektrum (s. Abb. 40) besitzt ebenfalls eine große Ähnlichkeit mit dem des Cyclocelabenzins. Eine NH-Bande bei 3300 cm^{-1} und eine intensive Carbonylbande bei 1610 cm^{-1} (Amid I) deuten auf eine Lactamstruktur. Auf ein aromatisches System lassen Banden zwischen 1400 und 1600 cm^{-1} schließen. Der Substitutionstyp läßt sich aus den drei Banden bei 690 , 710 und 755 cm^{-1} nicht eindeutig ableiten, doch sind ein mono- und ein ortho-disubstituiertes Benzolderivat wie bei Cyclocelabenzin nicht auszuschließen.

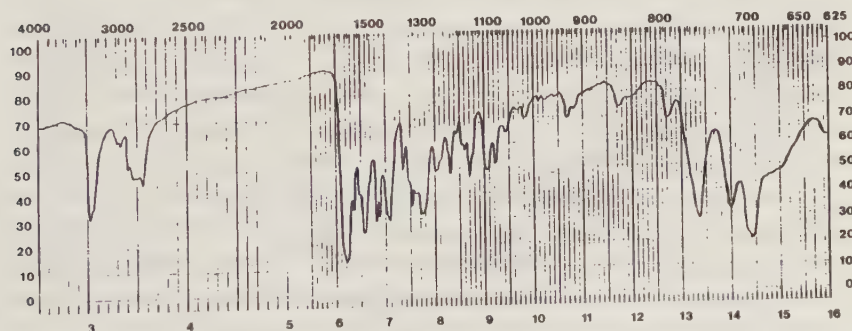
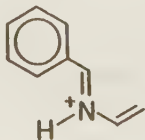


Abb. 40

IR-Spektrum (KBr) von Isocyclocelabenzin (Mm-II)

Das Massenspektrum von Mm-II läßt in der Fragmentierung gegenüber Cyclocelabenzin (Mm-I) neben Gemeinsamkeiten auch deutliche Unterschiede erkennen. Das intensivste Signal bei m/e 146 ist, wie die Hochauflösung zeigt, mit einem Zimtsäureamidfragment C_9H_8NO vereinbar. Die Signale m/e 131, m/e 103, m/e 91 und m/e 77 lassen auf Zimtsäure schließen. Die Intensität des Zimtsäurepeaks m/e 131 ist bei Mm-II-Acetat deutlich erhöht. Im UV- und NMR-Spektrum ist Zimtsäure jedoch nicht nachweisbar. Somit muß es sich um eine ringgebundene Zimtsäure handeln, wie sie als Bestandteil des 13-Macrocyclus der Spermidinalkaloide vom Celacinnintyp die Regel ist.

Wie bei Cyclocelabenzin (Mm-I) und Pleurostylin (PA-I) fehlt ein Signal bei m/e 274. Dieses Signal ist typisch für unverbrückte Spermidinalkaloide vom Celacinnintyp, bei denen der Acylrest z.B. Cinnamoyl oder Benzoyl nur über eine einfache Amidbindung mit dem Macrocyclus verknüpft ist und daher leicht abgespalten wird (42). Ein intensives Signal bei m/e 286 zeigt die Abspaltung einer C_7H_7 -Einheit aus dem Molekülion ($M^+ - m/e$ 91) an. Im hochaufgelösten MS läßt sich außerdem die Abspaltung einer C_2H_4 -Einheit aus dem Molekülion von Mm-II nachweisen. Die Hochauflösung zeigt weiterhin, daß es sich bei den Signalen m/e 159 und m/e 160 nicht um $C_{11}H_{13}N$ und $C_{11}H_{14}N$ (s. S. 52) handelt. Auch m/e 112 und m/e 70 (s. Abb. 13 S. 27) fehlen im MS von Mm-II-Acetat. Daraus muß man folgern, daß entweder kein Spermidinalkaloid vom Celacinnintyp vorliegt oder daß die $N-(CH_2)_4-N$ -Einheit des Macrocyclus eine Verbrückung aufweist. Gegen die erste Annahme spricht die Abspaltung von 72 Masseneinheiten ($M^+ - C_3H_6NO$), die auch bei Celacinnin und seinen Derivaten auftritt. Von KUPCHAN wird diese Fragmentierung als Bindungsspaltung zwischen C_7 und C_8 bzw. C_3 und C_4 verbunden mit Wasserstoffübertragung gedeutet. Allerdings ist damit auch ein Spermidinalkaloid vom Periphyllintyp, d.h. mit einem entgegengesetztem Einbau der Spermidinkette in den 13-Macrocyclus nicht auszuschließen (43). Ein intensives Signal bei m/e 132,082 = $C_9H_{10}N$ wäre gut mit einem Fragment folgender Struktur vereinbar.



Das ^1H -NMR-Spektrum von Mm-II zeigt gegenüber Cyclocelabenzin (Mm-I) einige Besonderheiten. So überlagern sich im Bereich von 3,8-4,1 ppm insgesamt 6 Protonen, die auch im 360 MHz-Spektrum eine Analyse der Spin-Systeme sehr erschweren (s. Abb. 44). Ganz anders verhält sich das Mm-II-Acetat. Hier findet man im Bereich von 3,5-4,3 ppm lediglich drei Protonen (s. Abb. 41). Bei 5,4 ppm zeigt ein benzylisches Proton (C-8-H) wie bei den übrigen acetylierten Spermidinalkaloiden eine β -Phenylalanin-Teilstruktur an. Interessanterweise ist das Spin-System auch bei Raumtemperatur ein klares Doppeldublett. Auch die übrigen Signale deuten an, daß das Mm-II-Acetat trotz der Acetylamid-

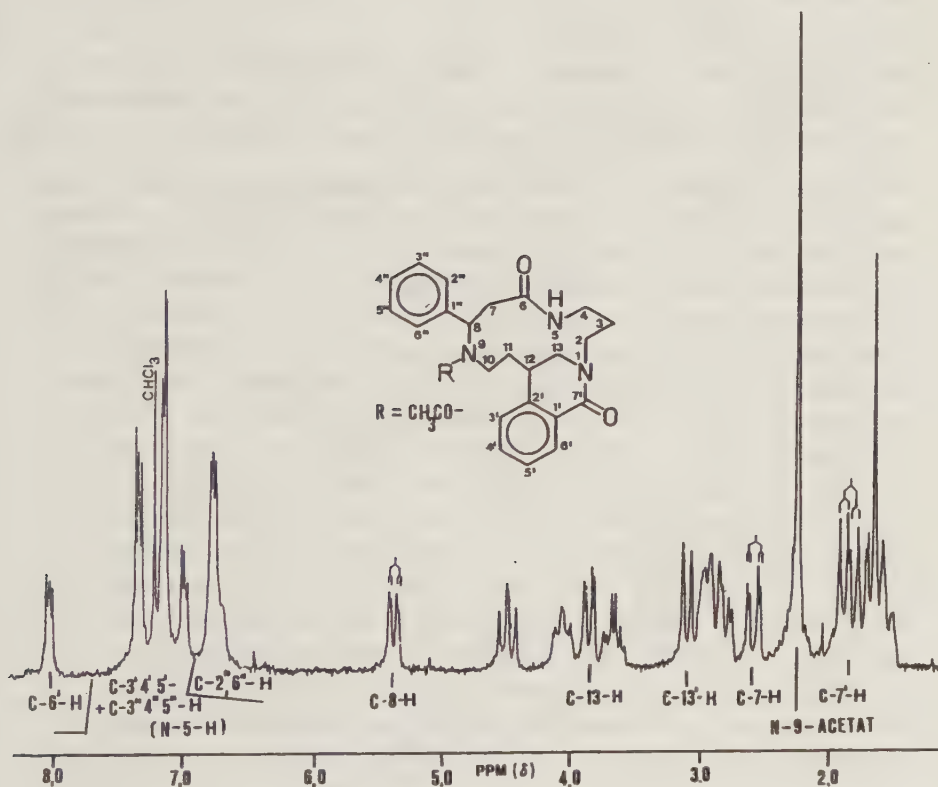


Abb. 41

200 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Acetyl-Isocyclocelabenzin (Mm-II-Acetat)
(CDCl₃, 25°C, TMS int.)

gruppe nicht als Gemisch von cis-trans-Amid-Konformeren vorliegt. Gleichzeitig besteht auch eine deutliche Beeinflussung der δ -Werte fast aller Protonen, auch von diesen, die sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft des acetylierten Stickstoffatoms (N-9) befinden.

Durch Entkoppeln des Doppeldubletts von C-8-H bei $\delta = 5,4$ ppm konnten die beiden Protonen am C-7 bei $\delta = 1,87$ und $2,60$ ppm lokalisiert werden. Neben der ausgeprägten Nichtäquivalenz der beiden Protonen wird auch ein überraschender Abschirmungseffekt festgestellt. Dieser wird in den Spektren von Celacinnin und Modellverbindungen mit β -Phenylalaninstruktur nicht beobachtet und muß somit in der Besonderheit der Struktur von Mm-II begründet sein (42,66).

Das 360-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Mm-II bestätigt sehr eindrucksvoll, daß sich die 9 aromatischen Protonen auf einen Phenylrest und einen ortho-substituierten Benzoylrest verteilen (s. Abb. 43).

Durch das ^{13}C -NMR war es möglich, die aliphatische Verknüpfungsstelle auf die Diaminobutaneinheit der Spermidinkette festzulegen. Von den sieben Methylengruppen des Macrocyclus liegt mit $24,5$ ppm nur eine einzige bei höherem Feld als $35,3$ ppm. Bei diesem Signal kann es sich nur um den mittleren Kohlenstoff einer unverbrückten Diaminopropaneinheit handeln. Innerhalb der Diaminobutaneinheit wiederum muß die Verknüpfung an einem der beiden mittleren C-Atome, d.h. in β -Stellung zum Stickstoff lokalisiert sein. An Stelle der für diese C-Atome üblichen δ -Werte von etwa 22 - 26 ppm liegen die δ -Werte bei Mm-II bei $35,34$ und $38,00$ ppm. Diese Tieffeldverschiebung wird durch Verknüpfung mit dem Benzoylrest verursacht. Bei Off-Resonance bildet das Signal bei $38,00$ ppm ein Dublett, womit die Verknüpfungsstelle angezeigt ist. Das Signal bei $35,34$ ppm erscheint als Triplet und entspricht somit der benachbarten CH_2 -Gruppe. Geht man von einem Spermidinalkaloid des Celacinnintyps aus, so wären die δ -Werte auf Grund der Verschiebungssinkremente gut mit C-12 als Verknüpfungsstelle vereinbar.

Die isomeren Spermidinalkaloide Lunarlin und Lunaridin aus *Lunaria biennis* zeigen jedoch, daß bei einer Pflanze der Einbau des Spermidins in einen Macrocyclus nicht unbedingt auf die gleiche Art und Weise erfolgen muß (100). Beim Celacinnintyp muß im Anschluß an das sekundäre Amid eine intakte Diaminopropaneinheit folgen. Liegt der Periphyllintyp vor, so muß die Diaminobutan-einheit samt Verknüpfungsstelle sich direkt an das sekundäre Amid-NH anschließen. Demnach sind mit dem ^{13}C -NMR im Prinzip 4 Strukturvarianten vereinbar, wobei Strukturvorschlag IV am wenigsten wahrscheinlich ist (s. Abb. 42).

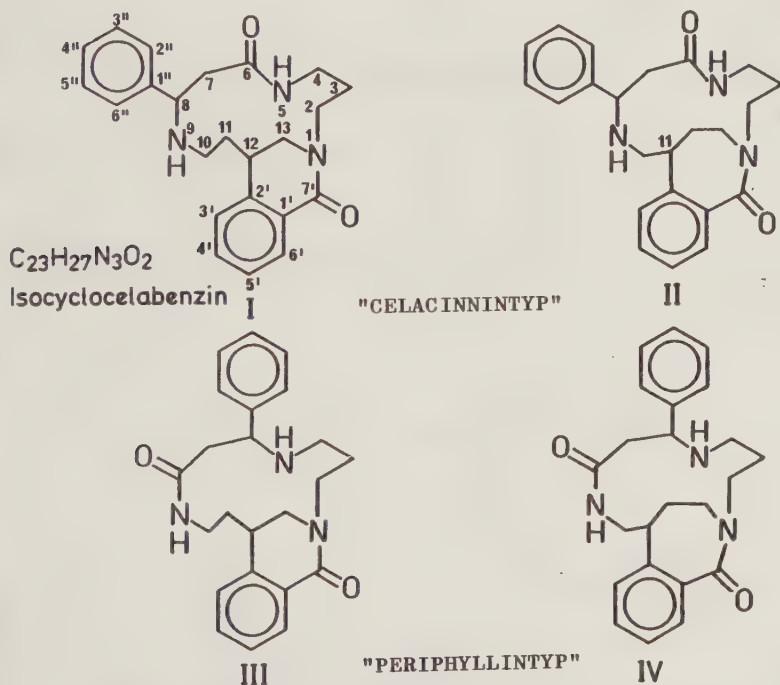


Abb. 42

Struktur (s. I) von Isocyclocelabenzin (Mm-II) und auf Grund des ^{13}C -NMR-Spektrums denkbare Strukturalternativen (II, III, IV)

T a b e l l e 11a

^1H -NMR-Spektraldaten von Isocyclocelabenzin in (Mm-II): Aromatenregion
(360 MHz, CHCl_3 = 7,26 ppm)

	ppm	Spin- system	Integral	Kopplungen J (Hz)
<u>Phenylrest am C-8:</u>				
C-2"-H C-6"-H	6,61	dd	2H	$J_{\text{ortho}} = 7,5$; $J_{\text{meta}} = 2$
C-3"-H C-4"-H C-5"-H	7,03- 7,12	m	3H	
<u>Ortho-substituiertes Benzoessäureamid:</u>				
C-3'-H	7,17	dd	1H	$J_{\text{ortho}} = 7-7,5$
C-4'-H	7,46	td	1H	$J_{\text{meta}} = 1,5-2$
C-5'-H	7,37	td	1H	
C-6'-H	8,12	dd	1H	

Alle Zuordnungen wurden durch Entkopplungsversuche bestätigt

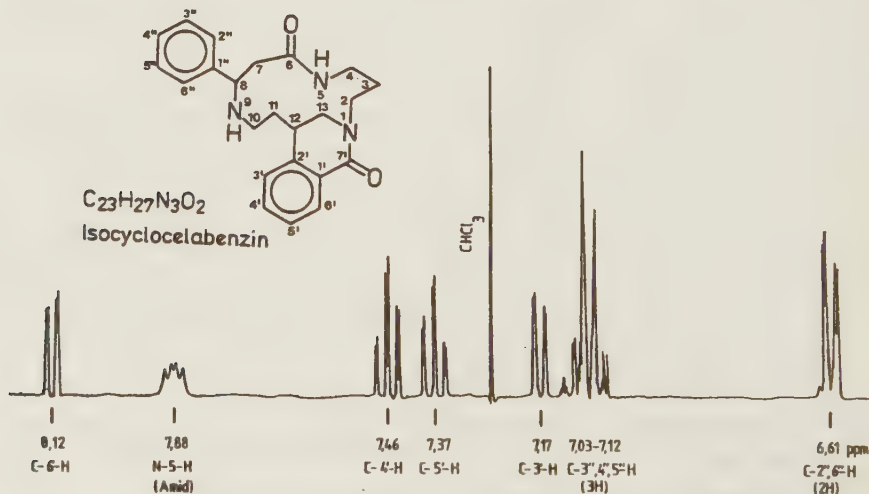


Abb. 43

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Isocyclocelabenzin (Mm-II):
Aromatischer Teilbereich ca. 6,5 – 8,2 ppm (in CDCl_3)

Durch Entkopplungsexperimente sollte es möglich sein, den Aufbau der CH_2 -Ketten und damit die Lage der Verknüpfungsstelle in Mm-II festzulegen. Durch die Überlagerung von Spin-Systemen, z.B. im Bereich von 3,8 bis 4,1 ppm, war allerdings die Spektralanalyse erschwert. Wir führten daher einige Entkopplungsexperimente zusätzlich mit schwacher Leistung des Störsenders durch, um somit einen genügend selektiven Effekt zu erzielen. Eindeutige Aussagen lieferten erwartungsgemäß Entkopplungsexperimente bei einzelstehenden Protonen.

Die Entkopplung des Amidprotons bei 7,88 ppm führte zu Veränderungen der Spinsysteme bei $\delta = 4,0$ (m, 5H) und 3,0 ppm (m, 2H) und zeigte dadurch die Lage der beiden nichtäquivalenten Protonen am benachbarten Kohlenstoff C-4 an. Der AM-Teil des AMX-Systems der β -Phenylalanin-Teilstruktur wird von den Doppeldubletts bei 2,08 und 2,30 ppm gebildet (s. Abb. 45). Das Doppeldublett des X-Teils, das dem benzyllischen Proton am C-8 zukommt, ist bei 3,95 ppm als Teil eines Multiplettberges von 5 Protonen nur schwer erkennbar (s. Abb. 44). Das Doppeldublett bei 2,30 ppm integriert deshalb für zwei Protonen, weil sich darunter noch das Multiplett eines weiteren Protons verbirgt. Ein weiteres Doppeldublett eines Einzelprotons befindet sich bei 3,74 ppm. Dabei muß es sich um eines der Protonen am Kohlenstoff zwischen macrocyclischem Brückenkopfatom und Stickstoffatom der Diaminobutaneinheit handeln. Strukturvorschlag IV scheidet damit sicher aus, weil das Proton als Doppeldublett auftritt und nicht in Nachbarschaft zum Amidproton stehen kann. Die Entkopplung dieses Doppeldubletts bei 3,74 ppm führt zu Veränderungen der Multiplette bei ca. 3 ppm (m, 2H) und ca. 3,9 ppm (m, 5H). Damit verbirgt sich unter dem Multiplett zwischen 2,9 und 3,05 ppm sowohl das Proton am C-Atom der Verknüpfungsstelle als auch ein Proton in Nachbarschaft zum sekundären Amid-NH. Entkopplung dieses Multipletts verändert die Doppeldublette bei 3,74 und 3,89 ppm zu Dubletten einer CH_2 -Gruppe mit geminaler Kopplung von 13 Hz (s. Abb. 44). Die Lage bei derart tiefem Feld ist nur erklärbar durch die Nachbarschaft eines Amidstickstoffs und schließt daher Strukturvorschlag II aus.

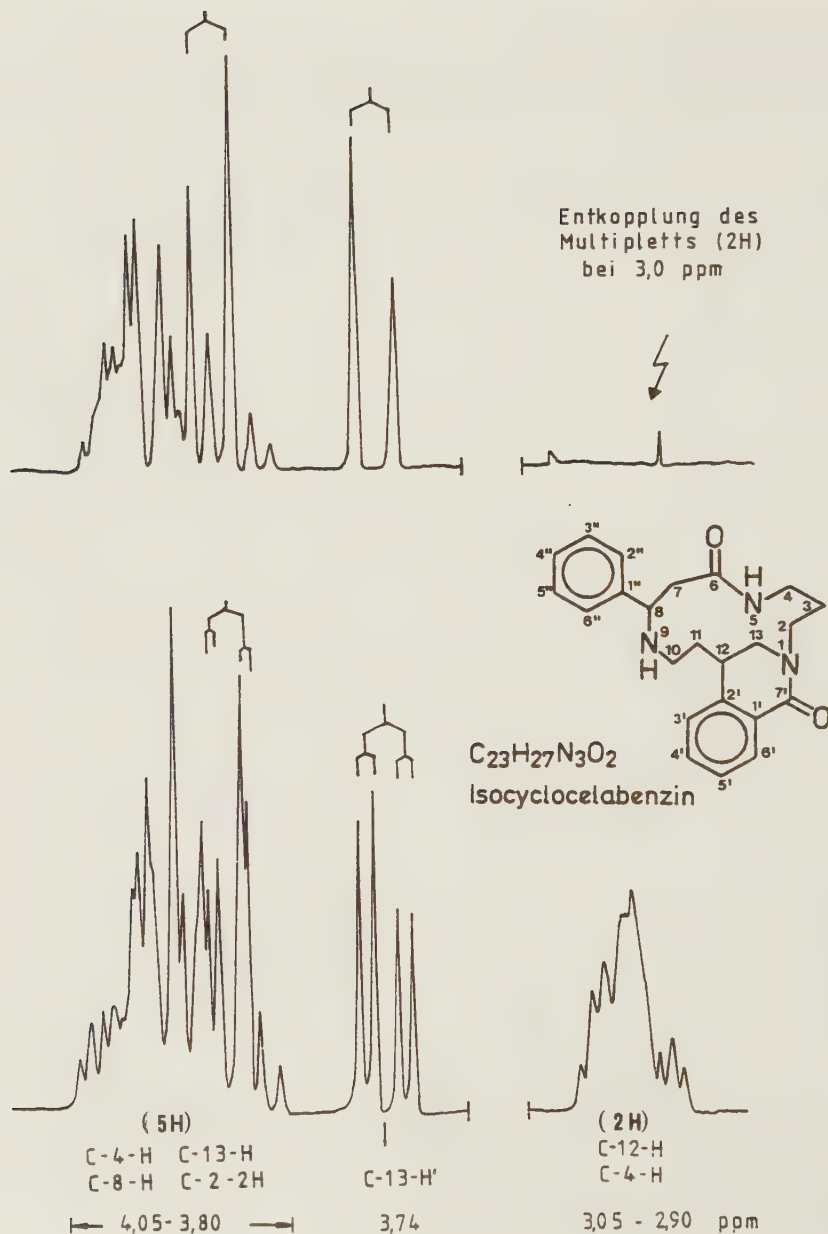


Abb. 44

360 MHz- 1H -NMR-Spektrum von Isocyclocelabenzin (Mm-II):
Aliphatischer Teilbereich ca. 2,8 - 4,2 ppm (in $CDCl_3$)

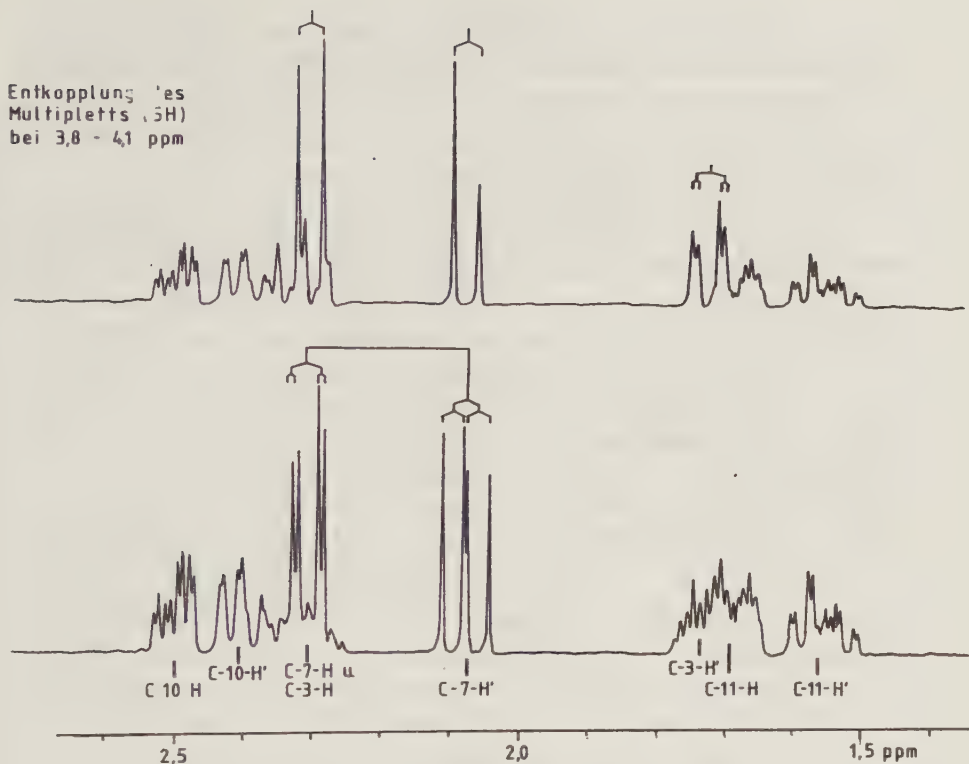


Abb. 45

360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Isocyclocelabenzin (Mm-II):
Aliphatischer Teilbereich ca. 1,4 - 2,6 ppm

Die Unterscheidung zwischen den verbleibenden Strukturvorschlägen I und III erforderte weitere Doppelresonanzexperimente. Von den 5 Protonen des Multipletts zwischen 3,8 und 4,1 ppm wurden drei bereits zugeordnet. Bei den übrigen Protonen muß es sich zwangsläufig um die noch nicht zugeordnete CH_2 -Gruppe neben dem tertiären Amidstickstoff handeln. Die Entkopplung des gesamten Multipletts (5H) bei ca. 4 ppm führte nur bei 4 Protonen des aliphatischen Bereichs zu keiner Veränderung der Spinsysteme (s. Abb. 45).

Tabelle: 11b

¹H-NMR-SPEKTRALDATEN VON ISOCYCLOCELABENZIN (Mm-II) : 13-Macrocyclus
(360 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm)

	ppm	Spin- system	Kopplungen J(Hz)
C-2-H, H'	3,80-4,05	m	überlagert von C(4)-H, C(8)-H u. C(13)-H
C-3-H	2,32	m	teilweise überlagert von C-7-H und C-10-H'; $J_{3/3'} = 14,5$
C-3-H'	1,73	m	teilweise überlagert von C-11-H $J_{3/3'} = 14,5$; $J_{3'/4'} = 3$
C-4-H	3,80-4,05	m	$J_{4/5} = 7,5$
C-4-H'	2,90-3,05	m	überlagert von C-12-H
N-5-H(Amid)	7,88	dd	$J_{4/5} = 7,5$; $J_{4'/5} = 4,5$
C-7-H	2,30	dd	$J_{7/7'} = 13,5$; $J_{7/8} = 3$
C-7-H'	2,08	dd	$J_{7/7'} = 13,5$; $J_{7'/8} = 11,5$
C-8-H	3,95	dd	Teil des Multipletts (5H, 3,8 - 4,05 ppm) $J_{7/8} = 3$; $J_{7'/8} = 11,5$
N-9-H(Amin)	0,4 - 0,6	br.s. (1H)	
C-10-H	2,50	ddd	$J_{10/10'} = 12,5$; $J_{10/11} = 6,5$ $J_{10/11'} = 2,5$
C-10-H'	2,40	ddd	$J_{10/10'} = 12,5$; $J_{10'/11} = 2$; $J_{10/11'} = 10$
C-11-H	1,68	m	$J_{11'/11} = 14,5$; $J_{11/10'} = 2$
C-11-H'	1,55	m	$J_{11'/11} = 14,5$; $J_{11'/10} = 2,5$ $J_{11'/10} = 9,5-10$; $J_{11/12} = 9,5-10$
C-12-H	2,9-3,05	m	überlagert von C-4-H'; Kopplungen- nur indirekt zu bestimmen! $J_{12/11'} = 9,5$; $J_{12/13} = 2$; $J_{12/13'} = 5$
C-13-H	3,89	dd	Teil des Multipletts (5H, 3,8-4,05 ppm) $J_{13/13'} = 13$; $J_{13/12} = 2$
C-13-H'	3,74	dd	$J_{13'/13} = J_{13'/12} = 5$

Die Kopplungskonstanten sind angenäherte Werte

Die Zuordnung basiert auf 11 Doppelresonanzexperimenten

Es handelt sich dabei um die zwei Protonen (ddd) bei 2,4 und 2,5 ppm, sowie die zwei Protonen (m) zwischen 1,5 und 1,7 ppm. Die Entkopplung des Protons bei 2,50 ppm zeigte außerdem, daß alle vier Protonen miteinander koppeln. Es kann sich daher hier nur um die zwei benachbarten CH_2 -Gruppen am Aminstickstoff N-9 handeln. Dabei entsprechen die beiden 8-Liniensysteme (ddd) bei 2,4 und 2,5 ppm den zwei Protonen der unmittelbar am Aminstickstoff sitzenden CH_2 -Gruppe und die beiden Multiplette im Bereich von 1,5 bis 1,7 ppm den Protonen der β -ständigen CH_2 -Gruppe. Da die zweite CH_2 -Gruppe auch mit dem Brückenkopfproton bei ca. 3 ppm in Resonanz steht, muß für Mm-II der Strukturvorschlag I gelten (s. Abb. 42 S. 87). Mm-II besitzt demnach den 13-gliedrigen Lactamring des Celacinnin-Typs. Im Unterschied zum isomeren Cyclocelabenzin (Mm-I) liegt somit die Verbrückung mit dem Benzoylrest am C-12 des Macrocyclus.

12.1 ^{13}C -NMR von Isocyclocelabenzin (Mm-II)

Mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie war es möglich gewesen, für das Isocyclocelabenzin vier mögliche Strukturvarianten auszusondern. Bisher lagen noch keine ^{13}C -NMR-Arbeiten bei derartigen macrocyclischen Spermidinalkaloiden vor. Daher erschien es interessant, am Beispiel des Isocyclocelabenzins eine möglichst vollständige Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale zu erreichen. Außerdem sollte damit eine Basis für den Vergleich mit strukturell verwandten Spermidinalkaloiden geschaffen werden. Ferner war beabsichtigt, die Eignung der "Frequenzabhängigen Off-Resonance-Entkopplung" für diese Substanzklasse zu erproben (87, 101).

Bei der Off-Resonance-Entkopplung tritt bekanntlich eine reduzierte ^{13}C - ^1H -Kopplung, die sogenannte Restaufspaltung J_R , auf. Die Größe von J_R ist dem Abstand Δf_2 der Störfrequenz F_2 von der Resonanz der direkt an dem betreffenden Kohlenstoff gebundenen Protonen proportional, d.h. $J_R = \text{const.} \cdot \Delta f_2$ (87). Die Restaufspaltungen J_R werden für eine bestimmte Protonensorte daher umso kleiner, je näher Entkopplungsfrequenz und Resonanz dieser Protonen beieinander liegen. Dieses Verhalten wurde bereits bei der Interpretation des ^{13}C -NMR von Cyclocelabenzin (Mm-I) ausgenützt.

Noch besser als Zuordnungshilfe ausnutzen läßt sich der lineare Zusammenhang zwischen Restkopplung J_R und Off-Resonance-Abstand Δf_2 , wenn mehrere Off-Resonance-Spektren mit verschiedenen Entkopplungsfrequenzen F_2 bei gleichbleibender Senderleistung aufgenommen werden. Bei dieser sogenannten "frequenzabhängigen Off-Resonance-Entkopplung" kann graphisch eine Korrelation zwischen den chemischen Verschiebungen vom ^{13}C -Atom und daran direkt gebundener Protonen hergestellt werden (s. Abb. 47). Im Prinzip reichen hierfür zwei Off-Resonance-Spektren, deren Entkopplungsfrequenzen möglichst entgegengesetzt und außerhalb des Bereichs der Protonenresonanz, z.B. bei $\delta_H = \text{ca. } -1\text{ppm}$ und $\delta_H = \text{ca. } 9\text{ ppm}$ liegen sollen. Im Gegensatz zur selektiven Protonenentkopplung muß die genaue Lage der Protonen aus dem ^1H -NMR-Spektrum nicht unbedingt bekannt sein. Sie kann im Gegenteil sogar ermittelt werden, falls umgekehrt die ^{13}C -Zuordnung der betreffenden CH_n -Gruppe feststeht. Außerdem werden bei kürzeren Meßzeiten gleichzeitig Informationen für alle Signale des ^{13}C -Spektrums erhalten. Dies kann bei geringen Substanzmengen oder sehr labilen Verbindungen, wie dies in der Naturstoffchemie des öfteren der Fall ist, von erheblicher Bedeutung sein.

Abb.46a S.95 zeigt den aliphatischen Bereich des ^{13}C -NMR-Spektrums von Isocyclocelabenzin mit Off-Resonance-Entkopplung bei drei verschiedenen Störfrequenzen F_2 . Die Abhängigkeit der Restkopplung J_R von der Störfrequenz F_2 ist vor allem bei C-11 = 35,3 ppm gut zu sehen. Einen Sonderfall stellt das Signal bei 38,2 ppm dar, da hier eine CH_2 -Gruppe in ein Doppeldublett aufspaltet. Eine derartige Aufspaltung höherer Ordnung war bereits bei Cyclocelabenzin (Mm-I) aufgetreten. Hier ist sie ein sicheres Zuordnungskriterium für C-4, da nur hier die erforderliche Nichtäquivalenz der beiden Protonen mit ca. 1 ppm Differenz in den chemischen Verschiebungen gegeben ist. Die übrigen CH - bzw. CH_2 -Gruppen ergeben Dublette bzw. Triplette, deren Restaufspaltung J_R in Abb. 47 graphisch gegen die Störfrequenz F_2 aufgetragen ist. Der Schnittpunkt der Geraden ergibt die Lage der Protonenresonanz. Die auf diese Art und Weise ermittelten Werte sind in guter Übereinstimmung mit den tatsächlichen δ_H -Werten des ^1H -NMR-Spektrums (vgl. Tabelle 11b). Dadurch ist die Unterscheidung zwischen C-7 = 46,14 ppm und C-10 = 46,88 ppm möglich.

Die Übertragung auf die aromatischen Kohlenstoffatome war im Prinzip möglich, stieß aber auf experimentelle Schwierigkeiten. Da sechs ^{13}C -Signale für insgesamt acht aromatische Kohlenstoffatome in dem engen Bereich von 126,0 bis 128,4 ppm liegen,

kommt es zur Überlagerung von Signalen im Off-Resonance-Spektrum. Dadurch kann J_R nicht genügend genau bestimmt werden. Noch gravierender wirken sich jedoch Aufspaltungen höherer Ordnung aus (96). So zeigen die Signale bei 127,23 und 131,88 ppm Dublette mit einer Feinaufspaltung für $F_2 = 8300$ Hz bzw. 8600 Hz. Hierbei handelt es sich um Fernaufspaltungen, die normalerweise bei der reduzierten Kopplung J_R des Off-Resonance-Spektrums in der Linienbreite des Signals untergehen. Durch den großen Abstand der Resonanz der aromatischen Protonen von der Störfrequenz F_2 ist hier die "meta"-Kopplung $^3J_{CH}$ zu erkennen. Ganz anders sehen jedoch die Signalmultiplizitäten für die aromati-

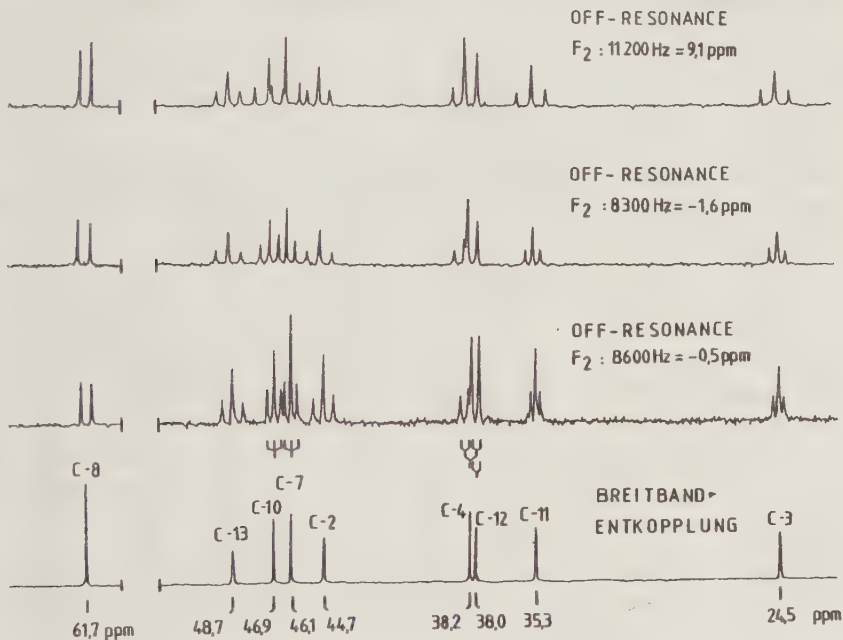


Abb. 46a

67,88 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von Isocyclocelabenzin (Mm-II) mit Off-Resonance bei verschiedenen Störfrequenzen F_2 : Aliphaten-region

($\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm int.St.}$)

schen CH-Gruppen bei einer Off-Resonance-Störfrequenz $F_2 = 11.200$ Hz, d.h. $\delta_H = 9,1$ ppm, aus. Durch die unmittelbare Nähe der Störfrequenz zur Resonanz der aromatischen Protonen sind die Beträge für J_R sehr reduziert. Deshalb treten in den meisten Fällen Aufspaltungen höherer Ordnung auf. Dies hängt damit zusammen, daß die Werte der C-H-Restkopplung J_R und der H-H-Vicinalkopplung ähnliche Größenordnung erreichen. NEWMARK und HILL sprechen von einer "virtuellen Kopplung im ^{13}C -NMR-Off-Resonance-Spektrum" (102). Diese Autoren stellten fest, daß besagte Aufspaltungen höherer Ordnung verschwinden, wenn die Differenz der chemischen Verschiebungen der vicinalen Protonen zunimmt oder die Größe der vicinalen H-H-Kopplung abnimmt.

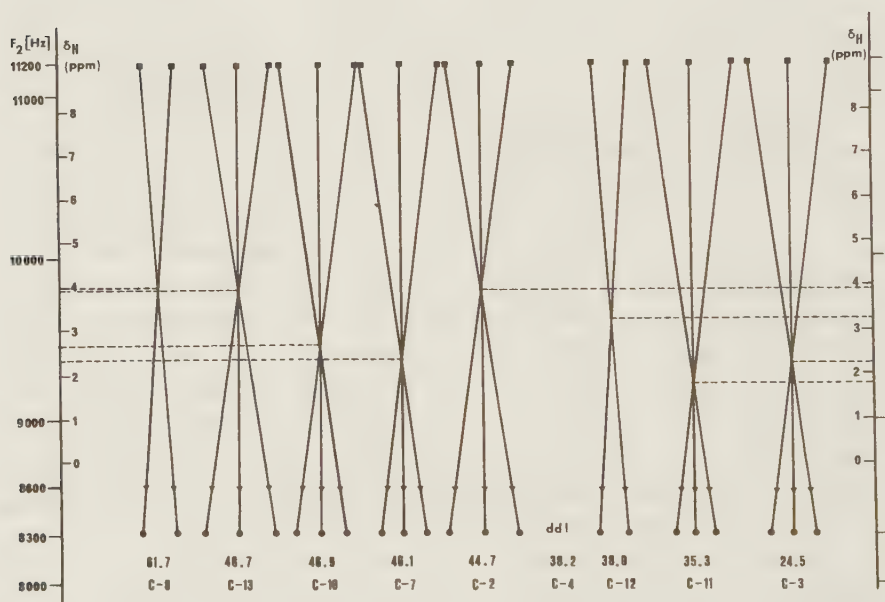
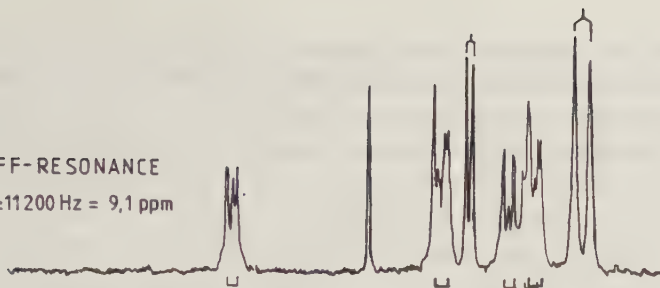


Abb. 47

Graphische Auswertung der Zusammenhänge zwischen J_R aus dem Off-Resonance- ^{13}C -NMR und δ_H aus dem ^1H -NMR

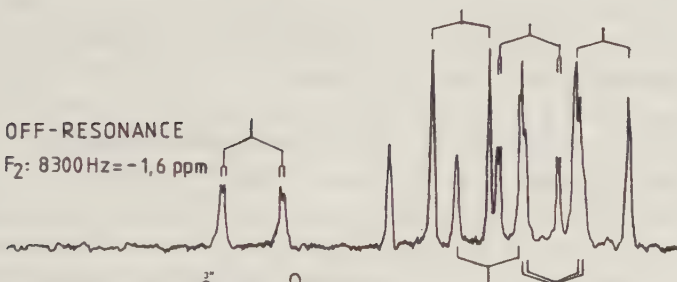
OFF-RESONANCE

$F_2: 11200 \text{ Hz} = 9,1 \text{ ppm}$



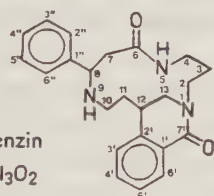
OFF-RESONANCE

$F_2: 8300 \text{ Hz} = -1,6 \text{ ppm}$



Isocyclocelabenzin

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$



BREITBAND-
ENTKOPPLUNG

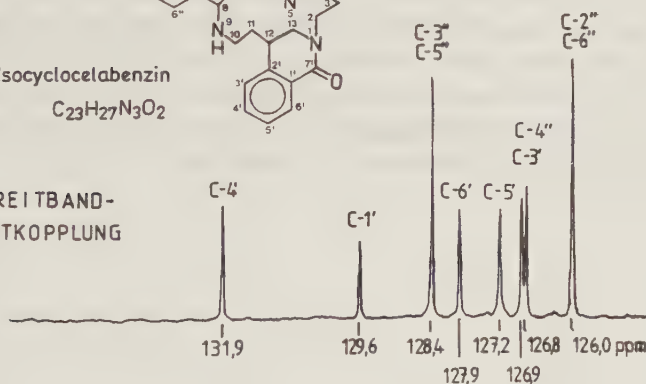


Abb. 46b

67,88 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von Isocyclocelabenzin (Mm-II) mit
Off-Resonance bei verschiedenen Störfrequenzen F_2 : Aromatenregion
($\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm int.St.}$)

Im Falle von Isocyclocelabenzin (Mm-II) sind die in Frage kommenden vicinalen H-H-Kopplungen konstant. Es handelt sich durchweg um aromatische ortho-Kopplungen von 7 bis 7,5 Hz. Das unterschiedliche Verhalten der aromatischen CH-Gruppen im Off-Resonance-Spektrum für $F_2 = 11200$ Hz, muß also auf Unterschieden in der Verschiebungsdifferenz der vicinalen Protonen beruhen. Interessanterweise geben die Signale bei 126,0 und 127,9 ppm auch für $F_2 = 11200$ Hz ein "normales" Dublett erster Ordnung. In diesem Fall konnte wie im aliphatischen Bereich die Lage der Protonenresonanz problemlos mit den Methoden der Frequenzabhängigen-Off-Resonance-Entkopplung graphisch ermittelt werden (s. Tab. 12). Das war eine zusätzliche Zuordnungshilfe für die Kohlenstoffatome C-2", C-6" und C-6'. Bei C-6' = 127.9 ppm würde eigentlich die bei der Störfrequenz $F_2 = 11200$ Hz optimal reduzierte Restkopplung J_R gute Voraussetzungen für eine Aufspaltung höherer Ordnung bieten. Dies verhinderte lediglich der große Unterschied der δ -Werte von C-6'-H = 8,12 ppm und C-5'-H = 7,37 ppm. Bei C-2" und C-6", den ortho-Kohlenstoffatomen des Phenylrestes am C-8, bewirken der höhere Betrag von J_R und die beachtliche Differenz von ca. 0,45 ppm in der Protonenresonanz zu den benachbarten Protonen am meta-Kohlenstoff gemeinsam das Dublett erster Ordnung (96). Damit hat die Frequenzabhängige Off-Resonance-Entkopplung einen wichtigen Beitrag zur Zuordnung der ^{13}C -Signale von Isocyclocelabenzin und verwandter Verbindungen geliefert (s. Tab. 12).

T a b e l l e 12

¹³C-NMR VON ISOCYCLOCELABENZIN (Nm-II) MIT FREQUENZABHÄNGIGER-OFF-RESONANCE-ENTKOPPLUNG

⁶ ₁₃ C (ppm)	C-Atom	Off-Resonance-Restkopplung J _R (Hz) für F ₂ = 8300 Hz / 8600 Hz / 11200 Hz	graphisch v. J _R ⁶ _H (ppm)	vegl. ¹ H-NMR (360 MHz)
24,54	C-3	t: 24 17 42	2,2	1,73 - 2,32
35,34	C-11	t: 20 17 44	1,7	1,55 - 1,70
38,00	C-12	d: 30 24 37	3,2	ca. 3,0
38,24	C-4	dd: * Aufspalt. höherer Ordnung	-	ca. 3,0 u. 4, 0
44,69	C-2	t: 37 30 34	3,9	3,80 - 4,05
46,14	C-7	t: 24 19 41	2,3	2,08 u. 2,30
46,88	C-10	t: 27 20 41	2,6	2,40 u. 2,50
48,66	C-15	t: 37 30 34	3,9	3,74 u. 3,89
61,69	C-8	d: 37 30 34	4,0	3,95
126,01	C-2,6	d: 59 53 17	6,7	6,61
126,79 x	C-4"	d: 63 58 58 "14"	7,2	7,03 - 7,12
126,87 x	C-3'	d: 63 59 ?	?	7,17
127,23	C-5'	d("dd") 68 61 "12"	7,4	7,37
127,90	C-6'	d: 71 65 7	8,1	8,12
128,37	C-3",5"	d: 65 58 "14"	7,2	7,03 - 7,12
129,58	C-1'	s: - - -	-	-
131,88	C-4'	d("dd") 68 61 "12"	7,5	7,46
142,04	C-2'	s: - - -	-	-
143,34	C-1"	s: - - -	-	-
165,14	C-7'	s: - - -	-	-
171,87	C-6	s: - - -	-	-

x : Diese Zuordnungen sind vertauschbar

*, "": Aufspaltungen höherer Ordnung, daher Auswertung unsicher

12.2 Zur Stereochemie von Isocyclocelabenzin (Mm-II)

Zur Stereochemie von Isocyclocelabenzin gelten im Prinzip die gleichen Überlegungen wie bei Cyclocelabenzin. Es liegt ein flexibler 13-Lactam-Ring mit trans-konfigurierter Amidgruppe vor. N-1, C-12 und C-13 sind zugleich Teil des cis-konfigurierten, starren 6-Lactamringes. Analog zu Cyclocelabenzin deuten auch hier die Kopplungskonstanten des Brückenkopfprotons C-12-H auf eine äquatoriale Lage. Die axiale Alternative erforderte einen Diederwinkel von fast 180° zwischen C-12-H und einem der Protonen am C-13. Dies ist mit den Kopplungskonstanten $J_{12/13} = 2 \text{ Hz}$ und $J_{12/13'} = 5 \text{ Hz}$ wohl nicht vereinbar. Da die beiden Protonen am C-2 sich im δ_{H} -Wert kaum unterscheiden, scheint sich die Anisotropie des Benzosäurecarbonyls auf beide etwa gleichstark auszuwirken. Denkbar wäre, daß dagegen C-3-H in der Ebene und damit in dem entschirmenden Einfluß des Benamidcarbonyls zu liegen kommt. Aussagen über die Konformation des flexiblen 13-Lactamringes müssen aber weitgehend Spekulationen bleiben.

13.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-IIa (Celabenzin)

Das Spurenalcaloid Mm-IIa liegt in seinem chromatographischen Verhalten bei der DC und HPLC zwischen den beiden Hauptalkaloiden Cyclocelabenzin (Mm-I) und Isocyclocelabenzin (Mm-II). Aus dem Massenspektrum und der CH-Analyse ergab sich die Summenformel $C_{23}H_{29}N_3O_2$. Die amorphe Verbindung schmolz bei 165-168°C und zeigte keine meßbare optische Aktivität, nämlich $[\alpha]_D^{25} = \pm 0^0$ ($CHCl_3$, $c = 0,45$).

Das UV-Spektrum besitzt Schultern bei λ_{max} 263 nm ($\epsilon = 965$) und λ_{max} 257 nm ($\epsilon = 1415$).

Das IR-Spektrum (s. Abb. 48) zeigt eine verbreiterte NH-Bande bei 3280 cm^{-1} , CH-Banden bei 2910 cm^{-1} , eine breite, intensive Amid-I-Bande bei 1610 cm^{-1} und eine schwächere Amid-II-Bande bei 1530 cm^{-1} .

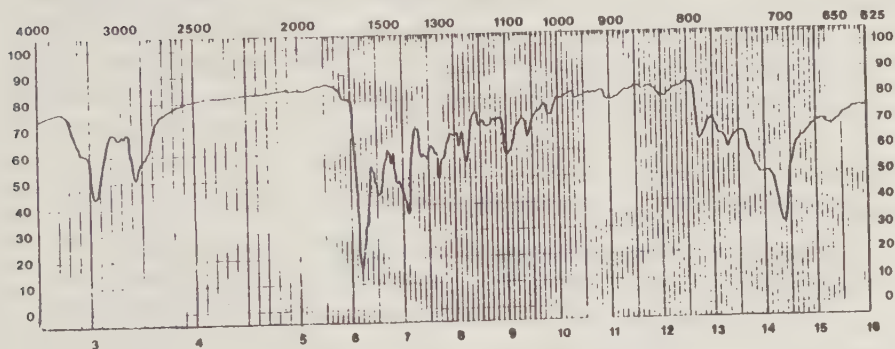


Abb. 48

IR-Spektrum (KBr) von Celabenzin (Mm-IIa)

Nach dem Massenspektrum besteht kein Zweifel mehr, daß es sich bei Mm-IIa um Celabenzin, ein macrocyclisches Spermidinalkaloid vom Celacinnintyp handelt. Der Basispeak m/e 105 entspricht einem Benzoylrest, der unter CO-Verlust zu m/e 77 fragmentiert. Da die Benzoylgruppe unverbrückt ist, kann sie direkt aus dem Moleküllion abgespalten werden, wobei der 13-Macrocyclus mit Phenylrest am C-8 übrig bleibt ($M^+ - m/e$ 105 $\rightarrow$ m/e 274). Auch weitere intensive Signale wie m/e 160, m/e 159, m/e 146, m/e 131, m/e 91, m/e 84, m/e 77 und m/e 70 erscheinen gleichfalls bei Celacinnin und seinen Derivaten.

Celabenzin wurde bisher nur in den Wurzeln von *Tripterygium wilfordii* gefunden und 1974 vom Arbeitskreis KUPCHAN in der Struktur aufgeklärt (41,42). Die angegebenen Daten stimmen im wesentlichen mit den von uns gefundenen Werten überein. Angaben über das NMR-Verhalten finden sich bei KUPCHAN nicht (41, 42). Erwartungsgemäß führt der partielle Doppelbindungscharakter der Benzoessäure-Amidbindung am N-1 zu cis- und trans-Amid-Konformeren. Aus Substanzmangel wurde auf ein ^{13}C -NMR verzichtet. Doch auch im ^1H -NMR zeigt das bei 130°C aufgenommene Spektrum deutlich den Unterschied gegenüber dem bei 80°C, bei dem einige verbreiterte und unscharfe Signale den Konformereneffekt noch erkennen lassen (s. Abb. 49). Das Signal für C-8-H ist auch bei 80°C schon ein scharfes Doppeldublett, da es durch den großen Abstand zur Amidbindung vom N-1 kaum beeinflusst wird.

Da alle bisher isolierten Spermidinalkaloide dieses Typs optisch aktiv sind und auch Celabenzin mit C-8 ein Asymmetriezentrum besitzt, war die fehlende optische Aktivität überraschend. Als Erklärung bietet sich an, daß bei der Aufarbeitung eine Racemisierung eingetreten ist. Da aber die Isolierung ebenso wie bei den anderen, optisch aktiven Spermidinalkaloiden durchgeführt wurde, scheint die fehlende optische Aktivität bei Celabenzin eher zufällig zu sein.

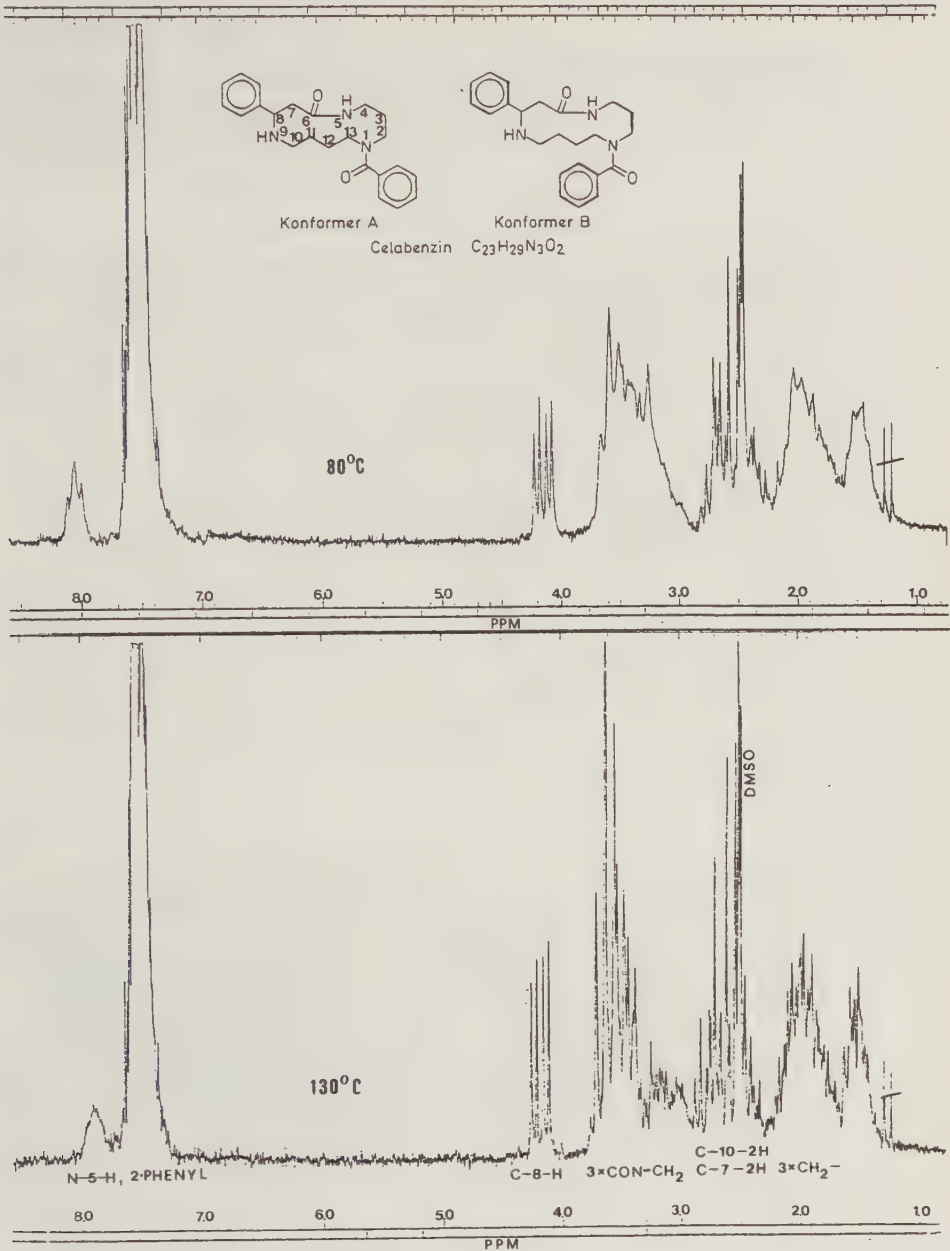


Abb. 49

100-MHz- 1H -NMR-Temperaturstudie von Celabenzin (Mm-IIa) in $DMSO-d_6$

14.0 Strukturaufklärung von Alkaloid Mm-IV (Hydroxy-Isocyclocelabenzin)

Die Hochauflösung des Molekülpeaks ($M^+ = 393,204$) ergab für Mm-IV die Summenformel $C_{23}H_{27}N_3O_3$. Somit besitzt Mm-IV wie Cyclocelabenzin (Mm-I) und Isocyclocelabenzin (Mm-II) 12 Doppelbindungsäquivalente, aber ein zusätzliches Sauerstoffatom. Die optische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{24} = +113,1^\circ$.

Bei der Acetylierung mit Pyridin/Acetanhydrid fiel nach wenigen Minuten bereits eine amorphe, schwer lösliche Monoacetylverbindung, $C_{25}H_{29}N_3O_4$ aus dem Reaktionsgemisch aus.

Das UV-Spektrum von Mm-IV ist mit $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4850$) und einer Schulter bei 265 nm ($\epsilon = 4130$) in guter Übereinstimmung mit den UV-Spektren von Mm-I und Mm-II.

Das IR-Spektrum von Mm-IV und Mm-IV-Acetat (s. Abb. 50 u. 51) läßt die strukturelle Ähnlichkeit mit Mm-II bzw. Mm-II-Acetat erkennen. So befindet sich im Spektrum von Mm-IV bei 1630 cm^{-1} eine breite Carbonylbande, die bei Mm-IV-Acetat in drei Einzelbanden bei 1600 , 1620 und 1650 cm^{-1} aufgelöst ist. Neben CH-Valenzschwingungen für einen gesättigten Kohlenwasserstoff bei 2940^{-1} lassen Banden bei 695 und 750 cm^{-1} auf einen monosubstituierten Benzolring schließen. Auffallend intensiv und verbreitert ist die Bande im Bereich von 3300 cm^{-1} .

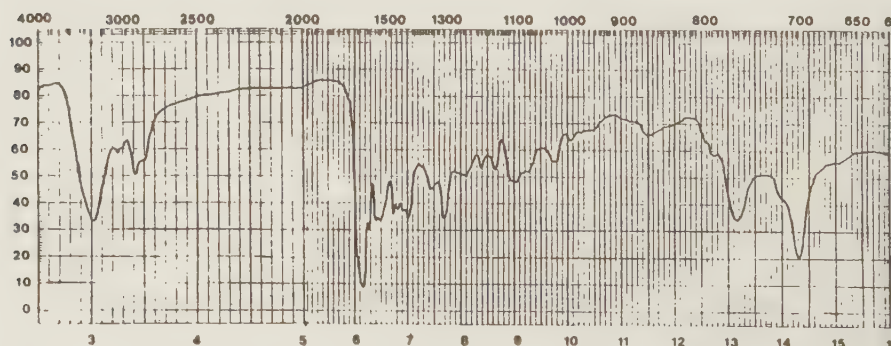


Abb. 50

IR-Spektrum (KBr) von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)

Dies läßt den Schluß zu, daß die NH-Bande zusätzlich von einer OH-Bande überlagert sein muß. Die Verbreiterung des Signals, vor allem bei Mm-IV, weniger bei Mm-IV-Acetat, deutet auf Wasserstoffbrückenbindungen hin.

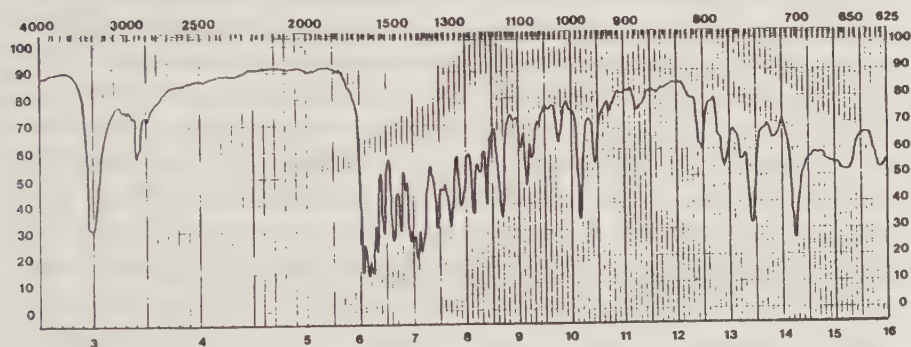


Abb. 51

IR-Spektrum (KBr) von N-Acetyl-Hydroxy-Isocyclocelabenzin
(Mm-IV-Acetat)

Das Massenspektrum ließ erkennen, daß in Mm-IV eine Hydroxylgruppe vorliegt. Es werden nämlich 17 und 18 Masseneinheiten aus dem Molekulation abgespalten. Die Hochauflösung bestätigte eindeutig, daß die Fragmentierung $M^+ - m/e\ 18 \rightarrow m/e\ 375$ eine Wasserabspaltung darstellt. Auch im MS von Mm-IV-Acetat war die Abspaltung von Hydroxyl bzw. Wasser aus dem Molekulation ($M^+ = 435$) deutlich nachweisbar. Vermutlich handelte es sich um eine tertiäre OH-Gruppe, da sie mit Acetanhydrid/Pyridin nicht acetyliert worden war. Das Mm-IV-Acetat mußte demnach eine N-Acetylverbindung sein, bei der im MS Wasserabspaltung ($M^+ - 18$) und Abspaltung der N-Acetylgruppe ($M^+ - 43$) miteinander konkurrieren. Beide Fragmentierungen zusammen ergeben den Basispeak $m/e\ 374$. Die Fragmente $m/e\ 131$, $m/e\ 103$, $m/e\ 91$ und $m/e\ 77$ bei Mm-IV und noch mit größerer Intensität bei Mm-IV-Acetat zeigen die ringgebundene Zimtsäure an, die im 13-Macrocyclus aller Spermidinalkaloide vom Celacinnintyp enthalten

ist. Auch die Abspaltung von 72 Masseneinheiten aus dem Molekülion tritt wie bei Celacinnin und verwandten Spermidinalkaloiden auf. Vor allem gegenüber Isocyclocelabenzin (Mm-II) sind zahlreiche Analogien feststellbar. So ist der hochaufgelöste Basispeak im MS von Mm-IV mit einem Zimtsäureamid (m/e 146,057 = C_9H_8NO) vereinbar. Die Abspaltung einer C_2H_4 -Einheit aus dem Molekülion, die beim Acetat fehlt, ist ebenfalls nachweisbar. In gleicher Weise ergibt die Hochauflösung des Signals e/m 160 das Fragment $C_{10}H_{10}NO$ (e/m 160,077; ber. 160,076) und nicht $C_{11}H_{14}N$ (ber. 160,113). Da auch m/e 112 (s. Abb. 13) im MS von Mm-IV-Acetat nicht nachweisbar ist, sollte wie bei Isocyclocelabenzin entweder eine Verbrückung innerhalb der $N-(CH_2)_4-N$ -Einheit oder ein andersartiger Alkaloidtyp vorliegen.

Im 25,2 MHz ^{13}C -NMR liegt nur ein Signal bei tieferem Feld als 38,4 ppm. Dieses Signal bei $\delta = 24,7$ ppm sollte in Analogie zu Isocyclocelabenzin dem mittleren C-Atom (C-3) einer intakten $-N-(CH_2)_3-N$ -Einheit zuzuordnen sein. Auffällig ist auch ein Signal bei 70,5 ppm, das einem quarternären Kohlenstoffatom entspricht. Es kann daher nur von einem Kohlenstoff stammen, der die Hydroxylgruppe trägt und gleichzeitig drei C-C-Bindungen aufweist.

Da die Zahl der Doppelbindungsäquivalente und die spektralen Daten wie bei Mm-I und Mm-II eine aliphatisch-aromatische C-C-Verknüpfung erfordern, muß das aliphatische Brückenkopfatom die Hydroxylgruppe tragen. Auf Grund der chemischen Verschiebung kommt nur einer der beiden mittleren C-Atome der Diaminobutaneinheit dafür in Frage. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt zwar erstaunlicherweise eine gewisse Verbreiterung der Signale. Dieser Effekt muß aber geräte- und aufnahmebedingt sein. Er besitzt nicht die Größenordnung, die z.B. charakteristisch wäre für eine cis-trans-Amid-Isomerie. Somit kann kein 9-gliedriger Lactamring vorliegen, sondern ein 13-Macrocyclus (82). In Analogie zu Isocyclocelabenzin (Mm-II) sind daher die vier gleichen Strukturalternativen wie bei Abb. 42 S. 87 zu diskutieren. Lediglich an Stelle eines Protons sollte sich am Brückenkopf-C-Atom eine OH-Gruppe befinden. Somit muß sich in α -Stellung zu einem der N-Atome eine isolierte CH_2 -Gruppe befinden. Diese muß im 1H -NMR-Spektrum ein AB-System mit geminaler Kopplung ergeben.

Die Auflösung des 60 MHz-Spektrums von Mm-IV reicht nicht aus, um ein derartiges System zu erkennen. Es sind jedoch deutliche Parallelen zu Isocyclocelabenzin (Mm-II) im NMR-Verhalten feststellbar. So ist die Aromatenregion bei Mm-IV ähnlich gut gegliedert und läßt durch das einzelne Proton bei 8,1 ppm die ortho-Substitution des Benzoylrestes erkennen. Im Bereich von 3,4-4,1 ppm liegt ein Multiplett, das für 6 Protonen integriert. Die N-Acetylierung bewirkt ebenfalls eine deutliche Veränderung in diesem Bereich. Trotz der geringen Substanzmenge und der schlechten Löslichkeit von Mm-IV-Acetat sind im 60 MHz- ^1H -NMR (DMSO-d_6 , 140°C) bei $\delta = 3,17$ und $3,65$ ppm zwei Dublette erkennbar. Es muß sich dabei um das AB-System der isolierten CH_2 -Gruppe handeln. Die Kopplungskonstante von ca. 12,5 Hz spricht eindeutig für eine geminale Kopplung. Die N-Acetylgruppe erscheint als Singulett bei 2,12 ppm. Die übrigen Signale aliphatischer Protonen sind im Rauschpegel des 60 MHz-Spektrums kaum erkennbar. Eine Auswahl unter den vier denkbaren Strukturalternativen kann auf Grund dieses Befundes nicht getroffen werden, zumal der Einfluß der N-Acetylgruppe auf die Lage der Signale schwer vorauszusagen ist.

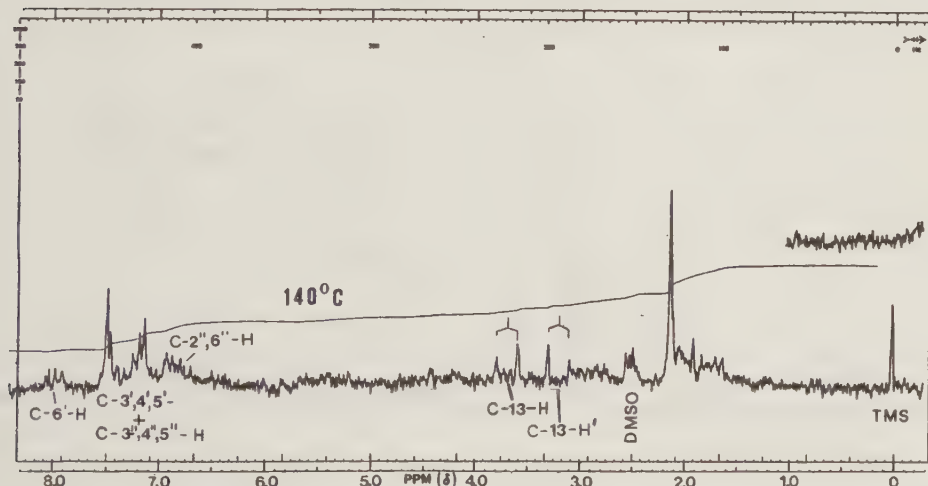


Abb. 52

60-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von N-Acetyl-Hydroxy-Isocyclocelabenzin
(Mm-IV-Acetat; in DMSO-d_6 , 140°C , TMS int. St.)

T a b e l l e 13

^{13}C -NMR-Signale von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)
(25,2 MHz, CDCl_3 , 55°C , TMS int.)

<u>13-Macrocyclus:</u>	<u>Ortho-subst. Benzoylrest am N-1:</u>
C-2 : 44,02	C-1': 128,03
C-3 : 24,70	C-2': 146,21
C-4 : 38,41	C-3': 123,81
C-6 : 172,58	C-4': 132,50
C-7 : 45,61	C-5': 127,78 ++
C-8 : 61,71	C-6': 128,77 ++
C-10 : 42,98 +	C-7': 165,09
C-11 : 40,84 +	<u>Phenylrest am C-8:</u>
C-12 : 70,49	C-1'': 143,13
C-13 : 54,11	C-2'': 126,24
	C-3'': 128,53
	C-4'': 127,09 ++

+, ++: Diese Zuordnungen sind vertauschbar.
Die Verbreiterung und geringe Intensität der Signale protonierter Kohlenstoffe muß aufnahmebedingt sein (Viskosität der konzentrierten Lösung, Konstanz des Entkoppelungssenders usw.)

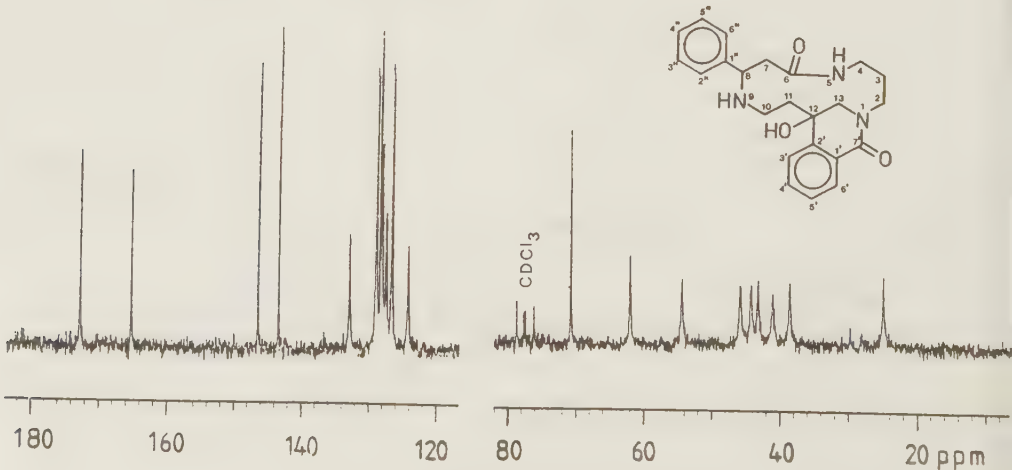


Abb. 53

^{13}C -NMR-Spektrum von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)

Unmittelbar vor dem Abschluß dieser Arbeit konnte ein 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Mm-IV erhalten werden. Darin ist ganz deutlich je ein Dublett mit der Kopplungskonstante von 12,4 Hz bei $\delta = 3,65$ und $3,83$ ppm zu erkennen. Die CH_2 -Gruppe liegt also in α -Stellung zu einem Amidstickstoff. Somit scheidet ein Celacinnintyp mit C-11 als Brückenkopfatom für Mm-IV als mögliche Struktur aus (vgl. Abb. 42). Außerdem sind die beiden Protonen der CH_2 -Gruppe (C-10) in Nachbarschaft zum Aminstickstoff deutlich als 8-Liniensystem (ddd) bei $\delta = 2,49$ und $2,77$ ppm zu erkennen. Die Entkopplungsexperimente zeigen, daß sie nur mit den beiden 8-Liniensystemen (ddd) bei $\delta = 1,77$ und $1,90$ ppm in Resonanz treten. Somit muß eine isolierte $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ -Einheit vorliegen. Dies ist nur möglich, wenn Mm-IV die Grundstruktur von Isocyclocelabenzin mit einer OH-Gruppe am Brückenkopfatom C-12 besitzt (s. Abb. 54). Wir haben Mm-IV daher Hydroxy-Isocyclocelabenzin genannt. Es handelt sich dabei um das erste Spermidinalkaloid, das eine Hydroxylgruppe und zusätzlich noch eine Verbrückung innerhalb der Spermidinkette besitzt. Die weiteren Entkopplungsexperimente bestätigten, daß unmittelbar im Anschluß an das Amid-NH drei CH_2 -Gruppen in Form einer intakten Diaminopropan-Einheit folgen, so daß auch hiermit der Periphyllintyp mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

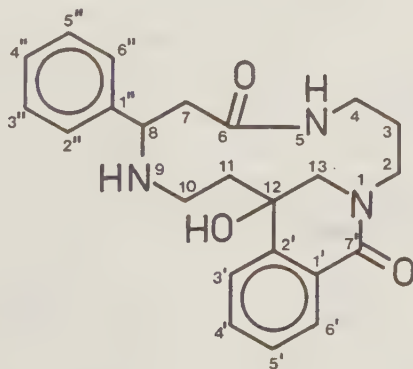


Abb. 54

Struktur von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)

Tabelle 14 a

¹H-NMR-Spektraldaten von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)
(400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,25 ppm int. St.)

	ppm	Spin- system	Kopplungen J (Hz)		
<u>Phenylrest am C-8:</u>					
C-2"-H	6,74	m			
C-6"-H					
C-3"-H	7,11	m ("dd")			
C-4"-H					
C-5"-H					
<u>Ortho-substituierter Benzoylrest am N-1:</u>					
C-3'-H	7,54	ddd (dd)	$J_{3',/4'} \text{ ca. } 7;$	$J_{3',/5'} = 2,2;$	$J_{3',/6'} = 0,6$
C-4'-H	7,52	ddd (td)	$J_{3',/4'} \text{ ca. } 7;$	$J_{4',/5'} = 6,3;$	$J_{4',/6'} = 1,4$
C-5'-H	7,42	ddd	$J_{3',/5'} = 2,2;$	$J_{4',/5'} = 6,3;$	$J_{5',/6'} = 7,7$
C-6'-H	8,08	ddd ("d")	$J_{3',/6'} = 0,6;$	$J_{4-/6'} = 1,4;$	$J_{5',/6'} = 7,7$

Alle Zuordnungen wurden durch Entkopplungsexperimente bestätigt

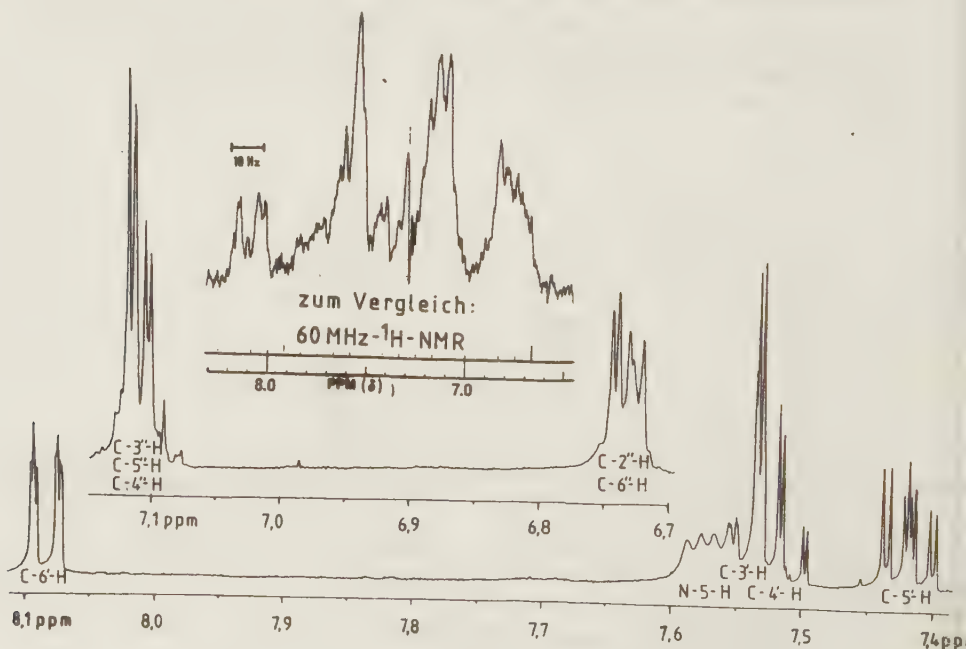


Abb. 55

400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV):
Aromatenregion ca. 6,5 - 8,2 ppm (CHCl₃ = 7,25 ppm int. St.)

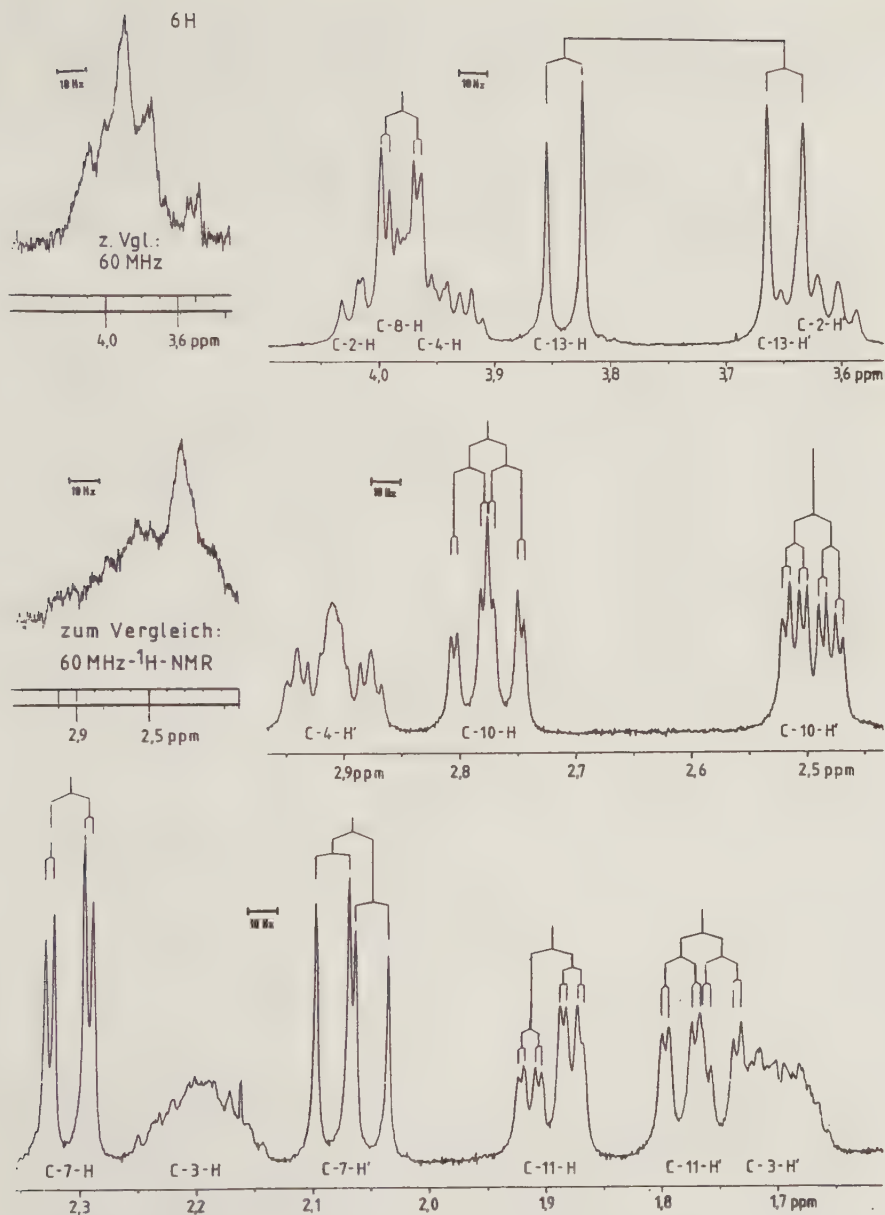


Abb. 56

400 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV):
Aliphatenregion ca. 1,6 -4,1 ppm ($\text{CHCl}_3 = 7,25$ ppm int. St.)

T a b e l l e 14 b

¹H-NMR-Spektraldaten von Hydroxy-Isocycloclabenzin (Mm-IV)
(400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,25 ppm int. St.)

	ppm	Spin- system	Kopplungen J (Hz)
<u>13-Macrocyclus:</u>			
C-2-H	4,00	(ddd)	Überlagert von C-8-H
C-2-H'	3,62	(ddd)	Überlagert von C-13-H'
C-3-H	2,20	m	J _{3/4} ca. 3,5; J _{3/4'} ca. 11;
C-3-H'	1,70	m	J _{3'/4} ca. 8; J _{3'/4'} = 3,6;
C-4-H	3,94	m	J _{3/4} ca. 3,5; J _{3'/4} ca. 8;
			J _{4/4} , ca. 13,5; J _{4/5} = 8,2;
C-4-H'	2,91	m	J _{3/4} , ca. 11; J _{3'/4'} = 3,6;
			J _{4/4} , ca. 13,5; J _{4'/5} = 4,4;
N-5-H (Amid)	7,57	dd(br.)	J _{4/5} = 8,2; J _{4'/5} = 4,4;
C-7-H'	2,31	dd	J _{4/5} = 3,0; J _{7/7'} = 13,5;
C-7-H'	2,07	dd	J _{7'/8} = 11,3; J _{7/7'} = 13,5;
C-8-H	3,98	dd	J _{7/8} = 3,0; J _{7'/8} = 11,3;
C-10-H	2,77	ddd	J _{10/11} = 2,2; J _{10/11'} = 10,5;
			J _{10/10'} = 12,7;
C-10-H'	2,49	ddd	J _{10'/11} = 6,1; J _{10'/11'} = 2,8;
			J _{10/10'} = 12,7;
C-11-H	1,90	ddd	J _{10/11} = 2,2; J _{10'/11'} = 6,1;
			J _{11/11'} = 14,3;
C-11-H'	1,77	ddd	J _{10/11'} = 10,5; J _{10'/11'} = 2,8;
			J _{11/11'} = 14,3;
C-13-H	3,83	d	J _{13/13'} = 12,4;
C-13-H'	3,65	d	J _{13/13'} = 12,4;

Die mit "ca." angegebenen Kopplungs-Konstanten mußten indirekt aus Entkopplungsexperimenten bestimmt werden. Die Zuordnung wurden durch Entkopplungsexperimente bestätigt.

Die Signale N-9-H (Amin) und C-12-OH sind im Spektrum nicht sicher lokalisierbar. Möglicherweise sind sie von den Signalen einer Verunreinigung im Bereich 0,7 - 1,4 ppm verdeckt. Ein durch Säurespuren im CDCl₃ katalysierter schneller Austausch dieser Protonen ist ebenfalls denkbar.

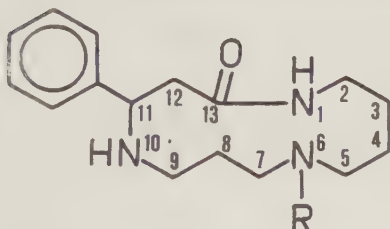
15.0 Übersicht über die Spermidinalkaloide der Celastraceen-Familie

a) offenkettig:



Maytenin (R = trans-Cinnamoyl-) (1973)

b) 13-Macrocyclus* vom Periphyllintyp:



Dihydroperiphyllin

(R = trans-Cinnamoyl-) (1977)

Mit olefinischer Doppelbindung im Spermidinteil:

Periphyllin (1974)

(R = trans-Cinnamoyl-, 2(3)) (Rev.1977)

Isoperiphyllin

(R = cis-Cinnamoyl-, 2(3)) (1977)

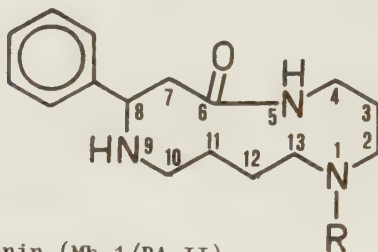
Neoperiphyllin

(R = trans-Cinnamoyl-, 4(5)) (1977)

* Periphyllin wird in einigen Übersichtsarbeiten (z.B. 72, 73) mit 8-gliedrigem Ringsystem aufgeführt. Dieser falsche Strukturvorschlag von 1974 wurde inzwischen revidiert (43) und der Beweis durch Synthese geführt (74).

Mit Perimargin ($M^+ = m/e$ 423) und Dihydroperimargin ($M^+ = m/e$ 425) wurden zwei weitere Spermidinalkaloide in *Peripterygia marginata* (Baill.) Loes. gefunden (43). Ihre Reinisolierung und Strukturaufklärung gelang bisher noch nicht.

c) 13-Macrocyclus* vom Celacinnintyp:



+ Celacinnin (Mh 1/PA-II) (1974)
(R = trans-Cinnamoyl-)

+ Celallocinnin (Mh 2/PA-III) (1974)
(R = cis-Cinnamoyl-)

+ Celabenzin (Mm IIa) (1974)
(R = Benzoyl)

Celafurin
(R = β -Furoyl-) (1974)

d) 13-Macrocyclus* zusätzlich verbrückt mit Acylrest R:

+ Pleurostylin (PA-I) (1978)
(R = cis-Cinnamoyl-, in ortho-Position mit C-2 des Macrocyclus verbrückt)

+ Cyclocelabenzin (Mm-I) (1978)
(R = Benzoyl, in ortho-Position mit C-3 des Macrocyclus verbrückt)

+ Isocyclocelabenzin (Mm-II) (1978)
(R = Benzoyl, in ortho-Position mit C-12 des Macrocyclus verbrückt)

+ Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)
(R = Benzoyl, in ortho-Position mit C-12 des Macrocyclus verbrückt zusätzlich am C-12 eine OH-Gruppe)

* Die Bezifferung des Ringsystems erfolgte nach den Originalarbeiten. Jahreszahlen geben die erstmalige Publikation der Struktur an.

+ Die in Klammern angeführten Kurzbezeichnungen entsprechen den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen.

16.0 Zusammenfassung

Aus den drei afrikanischen Celastraceenarten

Maytenus heterophylla (Eckl. u. Zeyh.) ROBSON subsp. heterophylla

Pleurostyliia africana Loes. und

Maytenus mossambicensis (Klotzsch) Blakelock
var. mossambicensis

wurden sieben verschiedene Alkaloide isoliert.

Die Isolierung erfolgte durch Extraktion, Säure-Base-Verteilung und durch Säulenchromatographie. Die Trennsysteme konnten soweit optimiert werden, daß z.B. die Trennung der Alkaloide von Maytenus mossambicensis auch erfolgreich mit Hilfe der präparativen HPLC durchgeführt werden konnte.

Die Strukturaufklärung erfolgte vorwiegend mit spektroskopischen Methoden, vor allem mit Hilfe der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz. Der Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde zum erstenmal in dieser Stoffklasse durchgeführt. Neben der roulinemäßigen Protonenbreitband- und Off-Resonance-Entkopplung, wurden in einigen Fällen zusätzlich die Methoden der Off-Resonance-Rauschentkopplung und der Frequenzabhängigen-Off-Resonance-Entkopplung (Multiple-Off-Resonance) angewandt.

Bei den isolierten Alkaloiden handelt es sich um macrocyclische Spermidinalkaloide, die sich strukturell von dem Polyamin Spermidin $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2)_4-\text{NH}_2$ ableiten. Die Verknüpfung von einem Molekül Zimtsäure mit den beiden endständigen NH_2 -Gruppen des Spermidins führt bei allen in der Arbeit beschriebenen Alkaloiden zu einem 13-gliedrigen Macrocyclus mit "exocyclischem Phenylrest".

1. Bei den Alkaloiden Celacinnin, Cellallocinnin und Celabenzin ist die mittelständige NH-Gruppe der Spermidinkette mit einem Cinnamoyl- bzw. Benzoylrest acyliert.

Vier Alkaloide stellen neue Strukturtypen dar, bei denen der 13-gliedrige Macrocyclus innerhalb der Spermidinkette eine C-C-Verknüpfung zu einem Benzoyl- bzw. Cinnamoylrest aufweist.

2. Pleurostylin enthält eine C-C-Verknüpfung zwischen C-2 im Macrocyclus und der ortho-Position eines cis-Cinnamoylrestes.
3. Cyclocelabenzin weist eine C-C-Verknüpfung zwischen C-3 im Macrocyclus und der ortho-Position eines Benzoylrestes auf.
4. Beim isomeren Isocyclocelabenzin ist der Ringschluß am C-12 des Macrocyclus erfolgt.
5. Hydroxy-Isocyclocelabenzin trägt am Brückenkopfatom C-12 zusätzlich eine OH-Gruppe.

Alle isolierten Alkaloide besitzen eine sekundäre und eine tertiäre Amidgruppe. Bei Celacinnin, Celallocinnin und Celabenzin wurde eine cis-trans-Amid-Isomerie festgestellt und die Temperaturabhängigkeit der ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spectren dieser Verbindungen untersucht. Bei den vier bisher unbekannten Alkaloiden fehlt eine cis-trans-Amid-Isomerie, denn durch die Verknüpfung des Benzoyl- bzw. Cinnamoylrestes mit dem 13-Macrocyclus entsteht ein sechs- bzw. siebengliedriger Lactamring, der die tertiäre Amidgruppe als cis-konfiguriert festlegt (81,82)

Pleurostylin und Isocyclocelabenzin wurden am National Cancer-Institute, Bethesda, Maryland, USA, gegen KB-Nasopharynx-Carcinom in vitro und P-388-Lymphocytenleukämie in vivo (Mäuse) getestet. In den genannten Testsystemen wurde keine Antitumoraktivität festgestellt.

Auf Seite 113 und 114 ist eine Übersicht über die Spermidinalkaloide der Celastraceen-Familie gegeben. Möglicherweise können bestimmte Spermidinalkaloidtypen, z.B. die von uns erstmals gefundenen Alkaloide mit verbrücktem 13-Macrocyclus, für die Chemotaxonomie der Celastraceen von Bedeutung sein.

EXPERIMENTELLER TEIL

17.0 Herkunft der Drogen

Maytenus heterophylla:

In dieser Arbeit wurde eine Droge untersucht, die im August 1974 von Dr. S. BLADT (Inst. f. Pharm. Arzneimittel lehre, München) im District Salisbury (Rhodesien) gesammelt worden war. T. MÜLLER (Collector's No. 2193) vom Herbario Rhodesiensi hat sie als *Maytenus heterophylla* (Eckl. u. Zeyh.) Robson subsp. *heterophylla* identifiziert. Eine im März 1976 an einem anderen Standort in Rhodesien gesammelte Droge dieser botanisch-systematisch außerordentlich komplexen Art ergab eine negative Vorprobe auf Alkaloide.

Pleurostylia africana:

Es wurden die getrockneten Blätter von *Pleurostylia africana* Loes bearbeitet, die August 1974 und März 1976 von Dr. S. BLADT in Rhodesien gesammelt worden waren. Beide Drogenchargen zeigten gleiches Alkaloidmuster.

Maytenus mossambicensis:

Unsere *Maytenus mossambicensis* (Klotzsch) Blakelock var. *mossambicensis* stammt ebenfalls aus Rhodesien (März 1976, Dr. S. BLADT). Zweige und Blätter besaßen nur quantitative Unterschiede in der Alkaloidführung.

18.0 Herkunft von Testsubstanzen bzw. Vergleichsspektren

Das Triterpen Friedelin stammte aus Institutsbeständen, Dulcit von der Fa. Merck.

Alkaloide zu Vergleichszwecken stellten zur Verfügung:

Codonocarpin (Prof. J.L. BEAL, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA); Astrocasin (Dr. LLOYD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA); Periphyllin und Isoperiphyllin (Prof. A. CAVÉ, Université de Paris-Sud, Frankreich). Ein IR- und ¹H-NMR-Spektrum von Celacinnin

erhielten wir von Prof. S.M. KUPCHAN, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA.

Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt!

19.0 Allgemeine Arbeitsmethoden

19.1 Fällungsreagentien für Alkaloide

a) Valsers Reagens auf Alkaloidsalze (103)

10 g Kaliumjodid werden in 100 ml Wasser gelöst und unter Rühren zu ca. 15 g Quecksilber-II-jodid gegeben. Die Mischung wird solange gerührt, bis fast das ganze Quecksilber-II-jodid gelöst ist und dann filtriert.

b) Mayers Reagens (104)

1.358 g Quecksilber-II-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst und in eine Lösung aus 5 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser gerührt. Die Lösung wird auf 100 ml mit Wasser verdünnt.

Test: Beim Alkaloidscreening (s. S. 11) werden 3 Tropfen Valsers- bzw. Mayers Reagens zu 2 ml einer salzsauren Lösung gegeben und mit einer in gleicher Weise behandelten Brucinlösung verglichen.

In vereinfachter Form wird dieser Test auf einem Uhrglas gegen dunklen Hintergrund durchgeführt. Hierbei werden zu 1 Tropfen der wäßrigen, sauren Lösung mit einer Tropfpipette vorsichtig 1 Tropfen Valsers- bzw. Mayers Reagens derart zugegeben, daß die beiden Tropfen sich langsam miteinander vermischen.

Die Anwesenheit von alkaloidartigem Material wird dann vermutet, wenn bei dieser Behandlung ein Niederschlag oder eine mehr als opaleszierende Trübung auftritt. Alle sauren Ausschüttelungsvorgänge wurden bei den einzelnen Isolierungsarbeiten derart auf ihre Effizienz überprüft.

19.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

19.21 Adsorbens

Kieselgel:

Verwendet wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 der Fa. Merck, 20 x 20 cm oder kleiner, Schichtdicke 0,25 mm. Die Platten wurden ohne weitere Vorbehandlung genutzt. DC mit Aluminiumoxid-Fertigplatten erbrachte keine Verbesserung der Trennungen.

19.22 Laufmittel

Alkaloidscreening

Benzol - Äthylacetat - Diäthylamin (70:20:10)

n-Butanol - Eisessig - Wasser (60:15:30)

Äthylacetat - Äthanol (90:10)

Chloroform - Butanol-2 (90:10)

Maytenus heterophylla (Alkaloide)

Äthylacetat - Äthanol - Wasser (90:5:5)

Äthylacetat - Äthanol (90:10)

Äthylacetat - Äthanol (87:13)

Pleurostyliia africana (Alkaloide)

Äthylacetat - Äthanol (90:10)

Chloroform - Butanol-2 (90:10)

Äthylacetat - Butanol-2 (85:15)

Maytenus mossambicensis (Alkaloide)

Chloroform - Methanol (90:10)

Dichlormethan - Methanol (92:8)

Dichlormethan - Isopropanol (97:8)

Terpene

Cyclohexan - Äthylacetat (80:20) (Laufmittel A)

Chloroform (p.a.) (enthält bis 1% Äthanol) (Laufmittel B)

Chloroform - Cyclohexan (80:20) (Laufmittel C)

Aromatische Carbonsäuren (o-Phthalsäure, Benzoessäure) (86)

Diisopropyläther - Ameisensäure - Wasser (90:7:3)

Toluol - Methanol - Essigsäure (75:15:10)

Zuckeralkohole (Dulcit = Galactitol)

Isopropanol - Äthylacetat - Wasser (93:11:6)

19.23 Detektion

Alle isolierten Alkaloide zeigten bei UV 254 eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzminderung. Sie war jedoch bei den durch katalytischer Hydrierung hergestellten Dihydroverbindungen ausgesprochen schwach. Eine Eigenfluoreszenz im langwelligen UV (360 nm) konnte nur bei nicht alkaloidischen Verunreinigungen und dem Zersetzungsprodukt (Startzone bei DC in den verwendeten LM-Systemen) festgestellt werden.

Sprühareagentien

a) Alkaloide

Kaliumjodoplateat : (48)

5 ml Hexachloroplatin-IV-säurelösung (10%) werden mit 97 ml Wasser versetzt und 100 ml KJ-Lsg. (6% in H₂O) zugegeben.

Die untersuchten Alkaloide zeigten eine konzentrationsabhängige Violettfärbung auf grauem Untergrund.

Dragendorffs Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (47)

Lsg. a) 0,85 g bas. Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst

Lsg. b) 8 g KJ werden in 20 ml Wasser gelöst.

Vorratslösung: gleiche Volumina der Lsg. a) und b) werden gemischt

Sprühlösung: 10 ml Vorratslösung und 20 ml Eisessig werden mit 100 ml Wasser gemischt.

Nachbehandlung: Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit kann nach Lufttrocknung der Platten zum Nachbesprühen verwendet werden
10% Schwefelsäure (62) bzw.
10% wäßrige Natriumnitritlösung (61)

Die Kombination von essigsauerm Dragendorff-Reagens und 10% NaNO₂-Lösung war die Standarddetektion bei der dünn-schichtchromatographischen Überprüfung während der Isolierung oder chemischen Umsetzung der Spermidinalkaloide. Die vom Nachbesprühen mit NaNO₂ entstehende Braunfärbung verschwindet bei Flecken mit niedriger Substanzkonzentration innerhalb weniger Minuten.

b) Triterpene

Liebermann - Burchard - Reagens (105)

Sprühlösung: Vorsichtig und unter Kühlung werden 5 ml Essigsäureanhydrid mit 5 ml Schwefelsäure (Konz.) gemischt. Das Gemisch wird unter Kühlung zu 50 ml Äthanol (abs.) vorsichtig zugefügt. Frisch bereiten!

Nachbehandlung: 10 min auf 110°C erhitzen.

Antimon-V-chlorid (106)

Sprühlösung : SbCl_5 (20%) in Chloroform

Nachbehandlung : 5 min/120°C

Komarowsky Reagens (53)

Lösung I : Schwefelsäure(50%)

Lösung II : 4-Hydroxybenzaldehydlösung (2% in Methanol)

Sprühlösung : Kurz vor Gebrauch werden 5 ml von I mit 50 ml von II gemischt

Nachbehandlung : 3-4 min auf 100°C, Triterpen A (violett) und Triterpen B (gelb); bei längerem Erhitzen bzw. bei höheren Temperaturen andere Farben (blau - violett)

c) Zuckeralkohole (Dulcit) (107)

Sprühlösung I : Natriummetaperjodat-Lösung (1%) 3-4 min an der Luft trocknen

Sprühlösung II : Kaliumpermanganat-Lösung (1%)

Aussehen : gelbliche Flecken auf violetterm Grund

d) Aromatische Carbonsäuren (o-Phthalsäure, Benzoessäure)

Bromkresolgrün Reagens Nr. 31 nach STAHL (108)

0,04 g Bromkresolgrün werden in 100 ml Äthanol gelöst. Die Lösung wird mit 0,1 n-Natronlauge bis zur eben auftretenden Blaufärbung versetzt.

Aussehen: Gelbe Flecken auf blauem Hintergrund.

19.3. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die in Chloroform gelösten Substanzen wurden entweder manuell oder mit dem Desaga Autoliner auf Kieselgelfertigplatten 60 F-254 (Merck oder Woelm, Schichtdicke 0,5 mm) strichförmig

aufgetragen. Am linken und rechten Plattenrand blieben 2 cm frei. Hier wurde das Substanzgemisch nochmals bzw. eine Vergleichssubstanz aufgetragen. Dieser Plattenrand konnte nach Abdecken der übrigen DC-Platte auch probeweise mit Sprühreagentien detektiert werden. Nach ein- oder mehrfacher Entwicklung in den jeweiligen Laufmittelsystemen bis zu einer Höhe von ca. 15 cm wurden die unter UV-Licht erkennbaren Zonen markiert und ausgeschabt. Bei größeren Mengen wurde im Mörtel verrieben, das Substanzgemisch in einem Erlenmeyer mit dem Elutionsmittel versetzt und einige Zeit am Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde durch eine G4-Fritte filtriert und mit Elutionsmittel nachgewaschen. Für Alkaloide und deren Derivate wurde als Elutionsmittel üblicherweise Chloroform - Methanol (95:5) verwendet, dem einige Tropfen Ammoniak (25%) beigemischt waren. Kleinere Mengen wurden in einem Zentrifugenglas mit Glaskugeln und Elutionsmittel versetzt, kurz am Whirlimix aufgewirbelt, zentrifugiert und die überstehende Lösung durch eine G4-Fritte filtriert. Diese Behandlung wurde mehrfach wiederholt. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt, dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft und zum Kristallisieren aufgestellt bzw. direkt für chemisch-physikalische Untersuchungen verwendet.

19.4 Säulenchromatographie

Als Adsorbens wurden zwei Sorten von Kieselgel verwendet:

- a) Kieselgel 60 Merck (Korngröße 0,063 - 0,200 mm)
- b) Kieselgel 60 Merck (Korngröße unter 0,063 mm)

Die Säulen wurden flüssig gepackt und zur besseren Sedimentierung des Kieselgels mit einem Massagestab behandelt. Vor dem Auftragen wurde noch einige Stunden Elutionsmittel durchgetropft, wobei die Füllhöhe konstant bleiben mußte. Zum Schutz der Startzone beim Nachfüllen von Elutionsmittel (über Schütteltrichter) wurde diese normalerweise mit einer Lage (ca. 1 cm) Seesand bedeckt. Das Eluat wurde üblicherweise an einem automatischen Fraktionssammler in Reagenzgläsern aufgefangen und Fraktionen mit gleichem DC-Bild vereinigt.

19.5 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Analytische und präparative HPLC wurden bei der Isolierung der Alkaloide aus *Maytenus mossambicensis* verwendet und sind auf Seite 139 beschrieben.

19.6 Umkristallisieren nach der isothermen Diffusionsmethode

Von der jeweiligen Substanz wird eine konzentrierte Lösung in einem oben offenen Behälter (z. Bsp. Rollrandgläschen) hergestellt. Dieser wird in einen zweiten Behälter (z.Bsp. Schraubdeckelglas) gestellt, der verschlossen wird und dessen Boden von einem weiteren Lösungsmittel bedeckt ist. Das äußere Lösungsmittel sollte einigermaßen leicht verdampfen und die Substanz sollte darin nicht gut löslich sein. Für die (innere) Lösung der Substanz haben wir bei den Spermidinalkaloiden meist Äthylacetat mit etwas Methanol verwendet und als äußere Phase n-Hexan oder Diisopropyläther.

20.0 Allgemeine chemische Arbeitsmethoden

20.1 Acetylierungen

Ca. 30-100 mg der Substanz wurden in ca. 1 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit etwa 1-1,5 ml Acetanhydrid versetzt. Nach kurzem Erwärmen blieb das Reaktionsgemisch mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen. War zu diesem Zeitpunkt bereits ein kristalliner Niederschlag zu beobachten, so wurde dieser abfiltriert. Ansonsten wurde unter Eiskühlung in ca. 20 ml Wasser eingerührt. Das ausgefallene Acetat wurde abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen bis kein Pyridingeruch mehr festzustellen war und in der Trockenpistole getrocknet. War die Ausbeute gering, so wurde das Filtrat samt Waschwässern noch einige Male mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformausschüttelungen wurden über Natriumsulfat getrocknet, einrotiert und aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert.

20.2 Katalytische Hydrierungen

Die Hydrierungen wurden in einer Hydrierapparatur nach PARR, Bauart GERHARDT, bei Raumtemperatur und Drücken von ca. 2 Kp/cm² durchgeführt. Als Katalysator diente 10% Palladium-Aktivkohle, etwa in gleicher Menge wie die eingesetzte Substanz. Ca. 50-100 der jeweiligen Substanz wurden in etwa 20 ml Methanol gelöst und meist über Nacht unter automatischem Schütteln hydriert. War bei der DC-Überprüfung noch deutlich Ausgangssubstanz festzustellen, wurde mit frischem Katalysator weiterhydriert. Nach beendeter Reaktion wurde filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Reinigung des Reaktionsproduktes erfolgte durch Umkristallisieren, in einigen Fällen nach vorangegangener präp. DC.

21.0 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden in der Trockenpistole über P₂O₅ bei Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Schmelzintervall bestimmten wir auf dem Kofler-Mikroheiztisch der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Optische Drehungen (OR)

Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur im lichtelektrischen Polarimeter LEP A 2 der Fa. Zeiss in 0,5%igen Lösungen in Chloroform oder Pyridin.

Elementaranalysen

Die Mikro-CHN-Verbrennungsanalysen erfolgten im CHN-Analysator 185 der Fa. Hewlett-Packard bei einer Einwaage von 0,6-0,8 mg. Nach GC-Trennung der Verbrennungsprodukte N₂, CO₂ und H₂O an einer Molekularsieb-Säule im Helium-Strom und WLD-Detektion, erfolgte die Auswertung durch einen Integrator 3370B der Fa. Hewlett-Packard in Relation zu geeigneten Referenzsubstanzen.

UV-Spektren

Die Spektren wurden mit dem Spektrophotometer DK-2 A der Fa. Beckman in 1 cm Quarzküvetten aufgenommen. Die Einwaagen betrug 0,5-0,6 mg, bei Substanzen mit kleinen ϵ -Werten bis zu 5 mg auf 50 ml Methanol p.a.

IR-Spektren

Die Aufnahmen erfolgten mit dem Spektrophotometer IR-8 der Fa. Beckman in KBr. Konzentrationen: 1-1,5 mg auf 150 mg KBr. Die angegebenen Werte sind auf $5-10 \text{ cm}^{-1}$ genau direkt aus den Spektren abgelesen.

^1H -NMR-Spektren

Die 60 MHz-Spektren wurden mit dem Kernresonanzspektrometer A-60A (CW-Technik) der Fa. Varian aufgenommen. Die üblichen Konzentrationen lagen hierbei bei 15-25 mg auf 0,2-0,3 ml Lösungsmittel.

Die 200 MHz-, 360 MHz- und 400 MHz-Spektren (PFT-Technik) wurden mit Kernresonanzspektrometern der Fa. Bruker (WP 200, WP 360 und WH 400) am Institut für Anorganische Chemie der Universität München bzw. bei der Fa. Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten aufgenommen. Die üblichen Konzentrationen betrugen 3-20 mg auf 0,4-0,5 ml.

Als Lösungsmittel dienten CDCl_3 und DMSO-d_6 ; als interner Standard das Signal von Tetramethylsilan ($\text{TMS} = 0 \text{ ppm}$) bzw. das Lösungsmittelsignal (z.B. $\text{CDCl}_3 = 7,25 \text{ ppm}$).

^{13}C -NMR-Spektren

Die 25,2 MHz-Spektren wurden am Central Research Institute for Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest mit einem Varian XL-100 gemessen. Die übrigen Spektren (50,29 MHz, 67,88 MHz und 90,52 MHz) wurden mit Geräten der Fa. Bruker (WP 200, WP 270 und WP 360) aufgenommen.

Die Spektren wurden üblicherweise in CDCl_3 und DMSO-d_6 bei Raumtemperatur gemessen, wobei entweder das Kohlenstoff- ^{13}C -Signal von Tetramethylsilan ($\text{TMS} = 0 \text{ ppm}$) bzw. vom Lösungsmittel (z.B. $\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm}$) als interner Standard dienten.

Neben der Protonenbreitbandentkopplung wurden auch verschiede-

dene Off-Resonance Techniken (Frequenzabhängige Off-Resonance-Entkopplung und Off-Resonance-Rauschentkopplung) eingesetzt.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit dem institutseigenen Massenspektrometer MS 30 (Einstrahlversion) der Fa. AEI aufgenommen. Die Proben wurden in μg -Mengen in $10 \times 1,6$ mm Glasröhrchen über den Direkteinlaß in die Elektronen-Stoß-Ionenquelle eingebracht. Die Beschleunigungsspannung betrug üblicherweise 4 KV und die Elektronenenergie 70 eV. Die Massenbestimmung erfolgte manuell mit Hilfe von Referenzsubstanzen, wie z.B. 2, 4, 6 - Tris - (pentadecafluorheptyl)-1, 3, 5-triazin.

Die Hochauflösung einzelner Massenfragmente wurde am Institut für Organische Chemie der Universität München mit einem AEI MS 902 Massenspektrometer (peak matching Methode) durchgeführt. Ein vollcomputerisiertes hochaufgelöstes Massenspektrum wurde an der Florida State University, Tallahassee (USA) mit einem AEI MS 902 aufgenommen.

Für die am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführten chemisch-physikalischen Messungen (OR, CHN-Analyse, UV, IR, ^1H -NMR und MS) danke ich Herrn Dr. Seligmann und seinen Mitarbeiterinnen.

Für die Hochauflösung von Massenspektren danke ich Herrn U. Seidel vom Institut für Organische Chemie, München, und dem Arbeitskreis von Prof. W. Herz, Florida State University, Tallahassee, USA.

Für ^{13}C -NMR-Spektren danke ich Herrn Dr. A. Neszmelyi, Budapest, (25,2 MHz) sowie den Herren Dr. V. Formacek (50,3 MHz) und Dr. W.E. Hull (67,88 und 90,52 MHz) von der Bruker-Physik AG.

Herrn Dr. B. Wrackmeyer, Institut für Anorganische Chemie der Universität München und Herrn Dr. Keller und Dr. Formacek, Bruker Physik AG, möchte ich für ^1H -NMR-Spektren am Bruker WP 200-Spektrometer danken. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. W.E. Hull, Bruker Physik AG, bedanken für die zahlreichen Hochfeld- ^1H -NMR-Spektren und Entkopplungsexperimente (Bruker WP 360 und WH 400).

22.0 Isolierungen

22.1 Isolierung von Alkaloiden aus Maytenus heterophylla

Die Bearbeitung der Droge erfolgte nach dem in Abb. 5 S. 15 angegebenen Schema. 300 g grob gepulverte Rinde wurden 50 Stdn. in einer Soxhletapparatur mit 96% Äthanol unter zeitweiser Erneuerung des Lösungsmittels extrahiert. 6,5 l des äthanolischen Extraktes ergaben nach Filtrieren und Einrotieren im Rotationsverdampfer einen Trockenextrakt von 18 g. Der luftgetrocknete Drogenrückstand wurde mit 10% Na_2CO_3 -Lösung alkalisiert und anschließend mit Chloroform extrahiert. In diesem Chloroformextrakt konnten jedoch chromatographisch nur minimale Alkaloidmengen nachgewiesen werden. Es wurden auch keine neuen evtl. schwächer basischen Alkaloide entdeckt. Die ausschließliche Löslichkeit in Chloroform und das Aussehen des Rückstandes ergaben jedoch einen deutlichen Hinweis auf Guttapercha. Deshalb wurde dieser nachträglich erhaltene Chloroformextrakt (2,1 g) nicht zur Alkaloidisolierung herangezogen.

Der äthanolische Extrakt wurde filtriert, zur Trockne eingeeengt (18 g) und dann in 80% Methanol gegen n-Hexan verteilt, um lipophile Stoffe zu entfernen. Die 500 ml wäßrig-methanolische Phase wurde auf etwa 200 ml eingeeengt und gegen Äther (6x100 ml) verteilt. Unlösliche Verbindungen erschwerten die Phasentrennung. Die wäßrige Phase wurde daher mit Na_2CO_3 auf pH 8 gebracht und mit Chloroform (4x200 ml) ausgeschüttelt. Die aufgetretenen Emulsionsprobleme konnten durch Zugabe von etwas Äthanol und Zentrifugieren (15 min/3000 U/min) weitgehend bewältigt werden. Zur Reinigung wurden die Chloroformphasen mit dest. Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert (450 mg).

Die Chloroformphase (450 mg) und die Ätherphase (210 mg) wurden getrennt gegen 2n-HCl verteilt, bis Mayers- und Valsers Reagens nur mehr opaleszierend getrübt wurden. Die Neutralisation der aus dem Äther stammenden HCl-Pha-

sen und das anschließende Ausschütteln mit CHCl_3 erfolgte stufenweise (pH 6, 7, 8, 9). Doch konnte keine pH-Abhängigkeit im Alkaloidmuster festgestellt werden. Bereits einmaliges Ausschütteln mit CHCl_3 bei pH 6 ergab die Hauptmenge des Rohalkaloids der Ätherfraktion (35 mg). Die aus der Chloroformphase stammenden HCl-Ausschüttlungen ergaben beim Neutralisieren (pH 7-8) eine weißliche Alkaloidfällung (30 mg) und weitere 176 mg Rohalkaloid. Die abfiltrierte Alkaloidfällung ergab nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat/Hexan weiße, verfilzte Nadelchen von Mh 1 (Celacinnin) mit Schmelzpunkt 201 - 203°C.

Die Rohalkaloidfraktion wurde über eine Kieselgelsäule (40 cm Länge, 3 cm Durchmesser) mit Äthylacetat : Äthanol = 90 : 10 als Elutionsmittel in Fraktionen zu 5 - 6 ml aufgetrennt.

Aus den Fraktionen 47 - 74 (67 mg) konnten weitere 35 mg Mh 1 (Celacinnin) erhalten werden.

Restliche Alkaloidfraktionen und Mutterlaugen von Kristallisationsversuchen wurden vereinigt (ca. 60 mg) und versucht, über präparative DC mit Kieselgelplatten (Merck) der Schichtdicke 0,5 mm durch zweimalige Entwicklung im Laufmittel Äthylacetat : Äthanol : Wasser = 90 : 5 : 5 zu trennen. Markierung der Zonen erfolgte im UV_{254} und Elution mit einer Mischung von CHCl_3 : EtOH : NH_3 (10%) = 15 : 5 : 1 nach der auf S. 121 beschriebenen Methode. Nach Umkristallisieren aus Äthylacetat/Hexan wurden weitere 7 mg Mh 1 erhalten. Mh 2 (Celallocinnin) konnte aus *Maytenus heterophylla* nicht in reiner, kristalliner Form erhalten werden. Bei der DC konnte eine gegenseitige Umwandlung von Mh 1 und Mh 2 auf den DC-Platten nach UV-Exposition festgestellt werden.

22.2 Isolierung von Triterpenen aus *Pleurostylia africana*

Beim Einengen des Petrolätherextraktes aus 2,8 kg Blattmaterial bildete sich ein Rückstand, der größtenteils wieder in Chloroform gelöst werden konnte. Umkristallisieren aus $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ lieferte ein weißes Kristallisat (474 mg).

Die dünnstschichtchromatographische Untersuchung in den drei Terpenlaufmitteln (S.119, s. Abb. 6 S. 18) zeigte, daß das weiße Kristallisat aus zwei Hauptkomponenten (Triterpen A und B) bestand.

Die weitere Auftrennung erfolgte säulenchromatographisch.

Adsorbens: 200 g Kieselgel 60, Korngröße 0,063-0,200
(Merck)

Säulenlänge : 40 cm

Säulendurchmesser: 3 cm

Elutionsmittel: Chloroform (p.a. Merck, enthält bis
1% EtOH)

Tropfgeschwindigkeit: 30 Tropfen/min

Fraktionierung: 10 ml/Fraktion

Nach DC-Kontrolle wurden die Fraktionen folgendermaßen zusammengefaßt:

Frkt. 20 - 29:	186 mg (Triterpen B)
Frkt. 30 - 35:	119 mg (Mischfraktion B + A)
Frkt. 36 - 42:	113 mg (Triterpen A)
Frkt. 42 - 60:	42 mg (Triterpen A + weitere Verbindungen)

Nach Umkristallisieren aus Chloroform/Diäthyläther konnten 79 mg Triterpen A (farblose Nadeln) und 110 mg Triterpen B (farblose Plättchen) erhalten werden.

22.21 Friedelin (Triterpen B)

$C_{30}H_{50}O$ (426,82) Ber. C 84,42% H 11,83%
Gef. C 84,13% H 11,66%

DC: Rf = 0,73 (Cyclohexan-EtOAc = 80:20)
Rf = 0,60 ($CHCl_3$ p.a.)
Rf = 0,55 ($CHCl_3$ - Cyclohexan = 80:20)
Detektion: Komarowsky Reagens (gelb)
Liebermann-Burchard-Reaktion (positiv)
Smp.: 262 - 264°C

$[\alpha]_D^{25} = -26,4^{\circ}$ (c = 1,02; in $CHCl_3$)

UV: (n-Hexan): Endabsorption ab $\lambda = 210$ nm

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 2960-2880 (CH-Val.); 1710
(CO, Keton); 1460 - 1430 ($-CH_3$, $-CH_2$ asymm.
Deform.) 1380 und 1360 ($C(CH_3)_2$ symm. Deform.)
In Übereinstimmung mit Literaturangaben (56,57)

1H -NMR: ($CDCl_3$, 60 MHz, TMS int.)
Sämtliche 50 Protonen im Bereich $\delta = 0,7$ -2,5 ppm,
davon 3 H (m) im Bereich $\delta = 2,2$ -2,5 ppm (in α -
Stellung zur CO-Gruppe)

MS: m/e (mind. 20% rel. Int.)
 $M^+ = 426$ (18), 273 (33), 218 (28), 205 (37),
191 (20), 179 (28), 163 (30), 161 (20), 137 (33),
135 (21), 123 (71), 121 (30), 111 (21), 110 (20),
109 (66), 96 (70), 95 (24), 83 (36), 82 (41),
81 (54), 69 (100), 67 (34), 55 (49), 41 (36)
In Übereinstimmung mit Literaturangaben (57)

22.22 Epifriedelinol (Triterpen A)

$C_{30}H_{52}O$ (428,84)

Ber. C 84,04% H 12,23%

Gef. C 83,10% H 11,26%

DC: Rf = 0,52 (Cyclohexan-EtOAc = 80:20)

Rf = 0,42 (Chloroform p.a.)

Rf = 0,35 ($CHCl_3$ -Cyclohexan = 80:20)

Detektion: Komarowsky Reagens (violett)

Liebermann-Burchard-Reaktion (positiv)

Smp.: 285-287°C (farblose Plättchen)

$[\alpha]_D^{22} = +17,8^\circ$ (c = 0,42 in Pyridin)

UV: (n-Hexan) Endabsorption bei $\lambda = 210$ nm

IR: (KBr) ν (cm^{-1}) 3620 (OH, frei); 3480 (OH in H-Brückenbindung); 2720 u. 2860 (CH-Val); 1460-1430 ($-CH_3$, $-CH_2-$ asymm. Deform.) 1380 u. 1360 ($C(CH_3)_2$, symm. Deform.). In Übereinstimmung mit Vergleichsspektrum (57).

1H -NMR: (Mischung $CDCl_3$ /DMSO- d_6 , 60 MHz, TMS int.)

Multiplettberg im Bereich $\delta = 0,7-2,2$ ppm, bei $\delta = 3,7$ breites Signal von OH-Gruppe oder Verunreinigung.

MS: m/e (mind. 20% rel. Int.)

M^+ = 428 (22), 413 (22), 275 (29), 234 (34), 233 (24), 231 (32), 220 (39), 207 (20), 206 (29), 205 (37), 191 (22), 179 (31), 177 (42), 165 (98), 163 (27), 150 (20), 149 (29), 137 (41), 135 (30), 125 (88), 123 (70), 121 (51), 111 (20), 109 (73), 107 (39), 96 (100), 95 (78), 93 (29), 83 (32), 82 (34); 81 (49), 69 (61), 67 (27), 55 (34), 44 (44).

Acetylierung von Epifriedelinol

20 mg Epifriedelinol wurden unter Erwärmen in 1 ml Pyridin gelöst und mit 1,5 ml Acetanhydrid versetzt. Anschließend wurde 1 1/2 Stdn. leicht erwärmt (Wasserbad) und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei entstand eine silbrig glänzende Ausfällung von Epifriedelinolacetat

(14 mg, Smp. 290–293°C), die abgenutzt und mit dest. Wasser nachgewaschen wurde. Aus dem Filtrat konnten nach Wasserzugabe (Eiskühlung) weitere 4 mg Epifriedelinol-acetat (Smp. 285–88°C) erhalten werden.

22.23 Epifriedelinolacetat (Triterpen A-Acetat)

$C_{32}H_{54}O_2$ ($M^+ = 470$)

DC: $R_f = 0,80$ ($CHCl_3$ p.a.)

Detektion: Komarowsky Reagens (violett)

Smp.: 290–293°C

$[\alpha]_D^{25} = +30,4^0$ ($c = 0,426$ in $CHCl_3$)

MS: m/e (mind. 20% rel. Int.)

$M^+ = 470$ (3), 213 (20), 205 (27), 177 (32), 175 (25),
163 (21), 149 (25), 147 (35), 137 (32), 135 (31),
125 (61), 109 (75), 108 (23), 107 (52), 96 (72),
95 (100), 93 (40), 83 (27), 82 (32), 81 (67), 79
(22), 69 (90), 67 (37), 55 (67), 43 (62), 41 (42)

22.24 Oxydation von Epifriedelinol (Triterpen A) zu Friedelin
(Triterpen B)

Da ein Oxydationsversuch mit Jones Reagens wenig befriedigte, wurde die Oxydation nach einem von G. SNATZKE (55) publiziertem Verfahren durchgeführt.

10 mg Epifriedelinol wurden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 10 mg CrO_3 und 2 Tropfen konz. H_2SO_4 versetzt. Es wurde 15 Stdn. am Magnetrührer gerührt. Nach Zugabe von etwas 35% H_2SO_4 wurde dreimal mit Chloroform geschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden noch zweimal mit 5% $NaHCO_3$ -Lösung und dest. Wasser geschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert.

DC im Terpen-Laufmittel B (S. 119) zeigte neben etwas Epifriedelinol (Ausgangssubstanz, $R_f = 0,42$ mit Komarowsky Reag. violett) als Hauptflecken das Oxydationsprodukt Friedelin ($R_f = 0,60$, mit Komarowsky Reag. gelb). Durch Umkristallisieren (Aceton/Diäthyläther) konnten 3 mg

weiße Substanz (Smp. 255°C) erhalten werden. Das IR (KBr) war mit dem von authentischem Friedelin (Triterpen B) identisch. Neben der kräftigen Carbonylbande bei 1720 cm⁻¹ war nur mehr eine minimale OH-Valenzschwingung (kleine Verunreinigung mit Ausgangssubstanz Epidriedelinol) festzustellen.

22.3 Isolierung von Dulcit aus Pleurostyliia africana

Der auf einige Liter eingeengte Äthanolextrakt von 2,8 kg Droge ergab beim Stehenlassen (4-8°C) eine bräunlich-kristalline Ausfällung. Diese wurde abgenutscht und kräftig mit Äthanol nachgewaschen (44 g). Umkristallisieren aus heißem Wasser und Methanol lieferte ca. 15 g weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 187-189°C.

Strukturbeweis für das isolierte Dulcit

Die isolierte Verbindung zeigte gleiches chemisch-physikalisches Verhalten wie authentisches Dulcit (Galactitol). Der Mischschmelzpunkt war ohne Depression, das IR-Spektrum (Überlagerungs-IR) in völliger Übereinstimmung mit der Vergleichssubstanz.

22.4 Isolierung von Alkaloiden aus Pleurostyliia africana

Ätherextrakt:

2,8 kg Droge wurden im Anschluß an die Petrolätherextraktion (s. Abb. 8, S. 20) mit Äther in einer Soxhletapparatur extrahiert. Der eingeengte Extrakt (32,5 g) wurde in etwa 2 l Äthylacetat aufgenommen und mehrmals gegen 2 n-HCl verteilt. Unlösliche Zwischenphasen wurden mit 2 n-HCl digeriert, bzw. in Chloroform aufgenommen und mit Salzsäure ausgeschüttelt. Die vereinigten salzsauren Phasen wurden mit gesätt. Na₂CO₃-Lösung auf pH 7-8 gebracht und die Alkaloidbasen mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus diesem gelbgrünen Rohalkaloid I (1,52 g) wurde durch nochmalige Säure-Base-Verteilung (CHCl₃/2n-HCl) ein gereinigtes Rohalkaloid (1,01 g) erhalten. Die weitere Auftrennung erfolgte säulenchromatographisch an 400 g Kieselgel mit

Äthylacetat : Äthanol (87:13) als Elutionsmittel. Die Fraktionen (8-10 ml) wurden nach DC-Überprüfung folgendermaßen zusammengefaßt:

Fraktion	Substanzflecken lt. DC	Rf-Bereich	Menge
69 - 97	Gemisch von Nebenalkaloiden und nichtalk. Verunreinigungen	0,55 - 0,8	17 mg
98 - 108	PA-I / PA-II	0,45 - 0,55	67 mg
109 - 173	PA-II stark angereichert/etwas PA-I	0,5	680 mg
174 - 239	PA-III angereichert/etwas PA-II	0,35 - 0,45	84 mg
240 - 320	PA-III neben PA-II und Nebenalkaloid mit niederem Rf	0,25 - 0,40	20 mg

Die weitere Verarbeitung (z.B. nochmalige Säulenchromatographie, Umkristallisieren) erfolgte zusammen mit entsprechenden Fraktionen aus dem Äthanolextrakt.

Äthanolextrakt:

Im Anschluß an die Ätherextraktion wurde die luftgetrocknete Droge noch 30-40 Stdn. im Soxhlet mit Äthanol extrahiert. Das beim Stehenlassen der eingeeengten Äthanollösung angefallene Rohdulcit wurde abfiltriert und der Extrakt zur Sirupdicke eingeeengt (ca. 1100 ml = ca. 350 g Trockenextrakt). Unter Zugabe von ca. 200-300 ml Wasser wurde in einem Scheidetrichter 3 mal gegen 1000 ml Chloroform verteilt.

Die Chloroformphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert (45 g) und in 200 ml CHCl_3 wieder gelöst. Beim Versuch mit 2n-HCl auszuschütteln, ergaben sich große Emulsionsprobleme, die Zentrifugieren (30 min bei 8000 rpm) notwendig machten. Zwischenphasen und Ausfällungen wurden daher zusätzlich zwischen Äther und 2n-HCl verteilt. Die Kontrolle der Verteilungsschritte erfolgte dünnschichtchromatographisch und mit Mayers u. Valsers Reagens. Bei der Neutralisation der auf verschiedenen Wegen gewonnenen HCl-Phasen fiel ein Teil der Alkaloidbasen als unlöslicher Niederschlag aus. Er wurde abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und das Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt. Insgesamt konnten dabei 5,6 g Rohalkaloid in verschiedenen Chargen gewonnen werden.

Die weitere Auftrennung erfolgte zunächst portionsweise (2-3 g) an Kieselgelsäulen (90 cm; 6 cm ϕ) mit Äthylacetat : Äthanol (87:13) als Elutionsmittel. Nach der DC wurden folgende Fraktionen zusammengefaßt:

Fraktion	Substanzflecken lt. DC	Rf-Bereich	Menge
111 - 191	Anreicherung von Nebenalkaloiden und nichtalkaloidischen Begleitstoffen	0,60-0,90	295 mg
192 - 220	PA-I / PA-II	0,45-0,55	612 mg
220 - 269	PA-II stark angereichert/etwas PA-I und PA-III	0,35-0,55	2150 mg
270 - 331	PA-III angereichert/etwas PA-II und Nebenalkaloid	0,25-0,40	364 mg
332 - 372	Nebenalkaloide mit etwas PA-III	0,20-0,40	107 mg

PA-II (Celacinnin) lag in genügender Menge und Reinheit vor und konnte daher direkt durch Umkristallisieren aus Äthylacetat/Hexan erhalten werden. Zur Isolierung von PA-I und PA-III wurden in dünnenschichtchromatographischen Reihenversuchen neue Trennsysteme erarbeitet und auf die Säulenchromatographie übertragen.

Säulenchromatographische Feintrennung von PA-I (Pleurostylin)

Adsorbens	: 180 g Kieselgel 60, Korngröße <u>unter 0,063 mm</u>
Säulenlänge	: 38 cm
Säulendurchmesser	: 3,8 cm
Tropfgeschwindigkeit	: 40 Tr./min
Fraktionierung	: 20-25 ml/Fraktion
Elution	: Chloroform - Butanol 2 - Gradient
	LM 1 : Chloroform (Vorlauf, zum Auftragen)
	LM 2 : Chloroform:Butanol-2=95:5 (500 ml)
	LM 3 : Chloroform:Butanol-2=90:10 (500 ml)
	LM 4 : Chloroform:Butanol-2=85:15 (500 ml)

Es wurden 612 mg einer säulenchromatographisch vorgereinigten Mischung der Alkaloide PA-I und PA-II in 2-3 ml Chloroform gelöst und mit einer Pasteurpipette vorsichtig aufgetragen. Die Startzone war durch ein Rundfilter mit kleinen Glaskugeln abge-

deckt. Nach dieser ersten Feintrennung von PA-I/PA-II wurde die gleiche Säule mit 300 ml Chloroform p.a. regeneriert und nochmals mit 654 mg einer PA-I/PA-II-Mischung beschickt. Ein Teil des Substanzgemisches stammte aus Feintrennung 1 bzw. aus Mutterlaugen der PA-II-Kristallisation. Die im automatischen Fraktionssammler aufgefangenen Fraktionen wurden nach ihrem DC-Verhalten zusammengefaßt.

Fraktion			Menge	
1.Trenn.	2. Trenn.	Substanzflecken lt. DC	1.Trenn.	2.Trenn.
27-29	37-44	Nebenalkaloide (Rf oberhalb PA-I)	4 mg	7 mg
29-45	45-54	PA-I (rein)	232 mg	401 mg
46-49	55-56	PA-I/PA-II-Mischfraktion	166 mg	26 mg
50-55	57-75	PA-II (rein)	180 mg	201 mg
56-65	76-99	PA-II/PA-III-Mischfraktion	27 mg	14 mg
66-80	--	PA-III mit Verunreinigungen	10 mg	--
Gesamtausbeute			619 mg	649 mg

Säulenchromatographische Trennung von PA-III

Adsorbens : 400. g Kieselgel 60 (Merck) Korngröße 0,063-0,200 mm

Säulenlänge : 40 cm

Säulendurchmesser : 5 cm

Tropfgeschwindigkeit : Frakt. à 20 ml/45 min

Elution : Äthylacetat : Butanol-2-Gradient

1. LM: Äthylacetat p.a. (500 ml Vorlauf)
2. LM: Äthylacetat : Butanol 2 = 90 : 10 (500ml)
3. Lm: Äthylacetat : Butanol 2 = 85 : 15 (2500ml)

Es wurden 685mg eines Alkaloidgemisches aufgetragen, in dem PA-III bereits stark angereichert war.

Fraktion	Substanzflecken lt. DC	Menge
126 - 155	PA-II / etwas PA-I	58 mg
156 - 200	PA-II (rein)	184 mg
201 - 235	PA-II / PA-III	112 mg
236 - 270	PA-III (rein)	220 mg
270 - 330	PA-III (angereichert) und Neben-alkaloide mit tieferem Rf	56 mg

22.5 Isolierung von Alkaloiden aus *Maytenus mossambicensis*

22.51 Isolierung des Rohalkaloidgemisches

Es wurden 480 g Blattdroge und 650 g Stengel- und Zweigstücke nach dem auf S. 66 dargestellten Isolierungsgang unter gleichen Bedingungen, aber in getrennten Chargen aufgearbeitet. Das Drogengut wurde mit 12 l Petroläther perkoliert, bis der Extrakt nur mehr schwach gefärbt war. DC-Überprüfung im Laufmittel CHCl_3 : Methanol (90:10) ergab keinen Hinweis auf Alkaloide im Petrolätherextrakt. Anschließend wurde die luftgetrocknete Droge mit ca. 12 l Äthanol (96%) perkoliert und mit weiteren 2-3 l abschließend noch in einer Soxhletapparatur extrahiert. Der äthanolische Extrakt wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 700 ml (Sirupdicke) eingengt und unter ständigem Rühren in 1000 ml Weinsäurelösung (5%ig) getropft. Zum Entfernen von Neutralstoffen wurde 4 mal mit 1000 ml Äther ausgeschüttelt. Die Neutralisation der weinsäuren Phase erfolgte unter pH-Kontrolle (Indikatorpapier: Merck, pH-Box) mit 10% NaOH bis etwa pH 6. Mit gesättigter Natriumcarbonatlösung wurde auf pH 7-8 eingestellt und die Alkaloidbasen mit Äther ausgeschüttelt (10 x ca. 1 l). Aus der Stengeldroge konnten auf diese Weise 4,26 g und aus der Blattdroge 8,80 g Rohalkaloidgemisch gewonnen werden. Die weitere Auftrennung in Einzelsubstanzen erfolgte über konventionelle offene Säulenchromatographie und präparative HPLC.

22.52 Konventionelle säulenchromatographische Auftrennung des

Rohalkaloidgemisches

Das Rohalkaloidgemisch wurde zunächst in 4 Portionen über offene Säulenchromatographie konventioneller Art (s. S. 122) aufgetrennt.

	Säule: I	II	III	IV
Rohalkaloidgemisch:	3,2 g	3,5 g	3,0 g	2,3 g
Säulenlänge :	60 cm	72 cm	62 cm	70 cm
Säulendurchmesser :	6,0cm	6,5cm	6,0cm	6,5cm
Adsorbensmenge :	700 g	850 g	700 g	850 g
Absorbens :	Kieselgel 60 (Merck), <u>Korngröße 0,063-0,20</u>			
Tropfgeschwindigkeit :	40-45 Tropfen/min			
Fraktionierung :	15-16 ml/Frakt.			
Elution :	Chloroform : Methanol - Gradient *			

LM-I	: CHCl ₃	: - (100%)	1000 ml	Vorlauf
LM-II	: CHCl ₃	: MeOH (99 : 1)	1000 ml	
LM-III	: CHCl ₃	: MeOH (98 : 2)	1000 ml	
LM-IV	: CHCl ₃	: MeOH (97 : 3)	1000 ml	
LM-V	: CHCl ₃	: MeOH (95 : 5)	3000 ml	Nachlauf
LM-VI	: CHCl ₃	: MeOH (93 : 7)	2000 ml	
LM-VII	: CHCl ₂	: MeOH (90 : 10)	1000 ml	
LM-VIII	: CHCl ₃	: MeOH (50 : 50)	1000 ml	
LM-IX	: -	: MeOH (100%)	5000 ml	

Nach einem Vorlauf (LM-I - LM-IV) wurde das Eluat dann auf dem automatischen Fraktionssammler aufgefangen, wenn eine gelbliche nichtalkaloidische Frontzone die Säule passiert hatte. Anschließend wurden die Fraktionen nach ihrem dünn-schichtchromatographischen Verhalten zusammengefaßt.

* Die Mengenangaben beziehen sich auf Säule I. Sie gelten mit kleinen Abänderungen auch für Säule II - IV, da dort LM-II u.-IV nicht eingesetzt wurden.

<u>Vereinigte Alkaloidfraktionen aus Säule I - IV</u>		<u>Menge</u>
Mm-I	(fast rein)	0,295 g
Mm-I/II	(neben etwas Mm-IIa und weiteren Verbindungen)	3,053 g
Mm-II	(fast rein)	1,538 g
Mm-II	(angereichert, etwas Mm-III)	1,187 g
Mm-III	(mit Mm-II und weiteren Verbindungen)	0,175 g
Mm-IV	(angereichert)	0,606 g
Gesamtausbeute an Alkaloidfraktionen		6,854 g

22.53 HPLC der vorgereinigten Alkaloidfraktionen

Der Versuch, in gleicher Weise wie bei der offenen Kieselgelsäule, Rohalkaloidgemisch durch präparative HPLC im Grammbereich aufzutrennen, gelang nicht, da die Säule durch harzartige Verunreinigungen verklebte. Die bei der präparativen HPLC eingesetzten Substanzgemische waren daher alle durch vorherige offene Säulenchromatographie (s.o.) vorkonzentriert worden. Lediglich bei der analytischen HPLC konnte das Rohalkaloidgemisch direkt eingesetzt werden.

Probenvorbereitung:

Zur analytischen HPLC wurden 5 mg Alkaloidgemisch zu 2 ml Dichlormethan gelöst und durch eine G4-Fritte gezogen. Von dieser Lösung wurden jeweils zwischen 2 und 10 µl in den LC eingespritzt. Zur präparativen HPLC wurden die Proben in ca. 15 ml Laufmittel gelöst und dann ebenfalls durch eine G4-Fritte gezogen.

Analytische HPLC:

Säule : LiChrosorb^R SI - 100-10 µm (30cmx4mm ID, Stahl)

Laufmittel : Dichlormethan : Methanol (97 : 3) (A)
Dichlormethan : Methanol (94 : 6) (B)
Dichlormethan : Isopropanol (94 : 6) (C)
Dichlormethan : Isopropanol (50 : 50) (D)

Detektion : Photometer bei 254 nm, wahlweise 280 nm

Durchfluß : 1,2 oder 2,0 ml/min

Präparative HPLC:

Gerät : Prep. LC 500 (Waters Assoc.)
 Säulen : 1 bzw. 2 Prep Pak^R 500 / Silica Cartouschen
 Laufmittel : B, C und D
 Durchfluß : 100-200 ml/min
 Detektion : RI x 50

Präparative HPLC-Durchgänge mit Laufmittel B:

Trennung Nr.	Probenmenge mg / ml	Säulen- anzahl	Durchfluß ml / min	Trenndauer min
1	460/20	1	150	22
2	500/16	1	150	22
3	2000/20	2	200	16
4	1300/15	2	200	16
5	200/5	1	100	26

Es wurden mit Laufmittel B insgesamt 56 mg Mm-I (Cyclocelaben-
 zin) und 936 mg Mm-II (Isocyclocelabenzin) in chromatographisch
 reiner Form erhalten. Mm-IIa konnte angereichert werden.

Präparative HPLC-Durchgänge mit Laufmittel C/D:

Trennung Nr.	Probenmenge mg	Säulen- anzahl	Durchfluß ml / min	Trenndauer min	Gesamt- ausbeute
6	1400	1	100	70	83,3%
7	1350	1	100	50	96,9%

Das Probengut bestand aus relativen Anreicherungen der Alkaloide
 Mm-I und Mm-IIa gegenüber dem Hauptalkaloid Mm-II. Sobald Mm-I,
 Mm-IIa und die Hauptmenge von Mm-II die Säule passiert hatten,
 wurde von Laufmittel C auf D gewechselt.

Hierbei wurden 459 mg Mm-I, 57 mg Mm-IIa und 745 mg Mm-II rein
 erhalten. Die Spurenalkaloide Mm-III und Mm-IV konnten bei der
 präp. HPLC mit dem Prep. LC 500 (Waters Assoc.) nicht rein er-
 halten, sondern lediglich etwas angereichert werden. Wegen des
 hohen Mm-II-Anteils der Proben war mit dem geräteeigenen Re-
 fraktometer eine Detektion von Mm-III nicht und von Mm-IV nur
 bedingt möglich.

22.54 Säulenchromatographische Feintrennung von Mm-IV

Adsorbens	:Kieselgel (Merck) Korngröße unter 0,063 mm		
Säulenlänge	: 27,5 cm		
Säulendurchmesser	: 2,5 cm		
Tropfgeschwindigkeit	: 40 Tropfen/min		
Fraktionierung	: 15-16 ml/Frakt.nach entsprechendem Verlauf		
Elution	: Chloroform : Methanol - Gradient		
	LM-I :CHCl ₃	(100%)	1000 ml
	LM-II :CHCl ₃ : MeOH	(97:3)	500 ml
	LM-III:CHCl ₃ : MeOH	(96:4)	1000 ml
	LM-IV :CHCl ₃ : MeOH	(95:5)	500 ml
			Vorlauf
			Alkaloidfraktionen
			Nachlauf

Nach dem Vorlauf konnten aus den Fraktionen 20-27 insgesamt 198 mg Mm-IV von ausreichender Reinheit für das ¹³C-NMR erhalten werden. Bei dem Versuch, das ¹³C-NMR in CHBr₃ bei 100°C aufzunehmen, zersetzte sich die Substanz teilweise. Die chromatographisch reine Fraktion 22 war zuvor abgetrennt worden (45 mg) und diente als Grundlage für die übrigen chemisch-physikalischen Untersuchungen.

23.0 Strukturaufklärungen

23.1 Celacinnin (Mh 1 bzw. PA-II)

$C_{25}H_{31}N_3O_2$	(405,54)	Ber.	C 74,04%	H 7,70%	N 10,36%
		Gef.	C 73,21%	H 7,40%	N 9,97%

Smp.: 201° - 203°C Lit. (42) 203-204°C

DC: Rf = 0,65 (EtOac - EtOH - H₂O = 95 : 5 : 5)

Rf = 0,49 (EtOac - EtOH = 90 : 10)

Rf = 0,38 (CHCl₃ - BuOH-2 = 90 : 10)

Rf = 0,33 (EtOac - BuOH-2 = 85 : 15)

$[\alpha]_D^{25} = -20,5^{\circ}$ (c = 1,15 in CHCl₃)

Lit. (42): $[\alpha]_D^{25} = -19^{\circ}$ (c = 0,16; CHCl₃)

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 218 (ϵ = 21500) ; 224 (ϵ = 17600)
278 (ϵ = 25200)

Lit. (42) : 223 (ϵ = 16000), 277 (ϵ = 23000)

IR: s.Abb. 10 S. 23:

(KBr) ν (cm^{-1}): 3340 u. 3300 (N-H); 2920 (CH-Val.); 1650 - 1630 (C=O, Amid I); 1590 N-C=O, Amid II); 1440; 1420; 1190; 1120; 965 (HC=CH, trans-Olefin); 760 u. 695 (monosubstit. Benzolring)

Lit.(42): (KBr, μm) 3,0 (br.); 6,02; 6,24; 6,46; 6,67; 13,0; 14,3

$^1\text{H-NMR}$: s.Abb. 11 S. 25:

(in CDCl_3 , 60 MHz, Raumtemperatur, TMS int.)

δ = 7,75 ppm (d, 1H, J = 15,5 Hz) C-7'-H; 7,2-7,7 (m, 11 H, davon Amid N-5-H mit DTFA austauschbar); 6,85 (d, 1H, J = 15,5 Hz) C-8'-H; 4,03 (br. t, 1H, J = 7Hz) C-8-H; 3,1-3,8 (br m, 6H); 2,53 (d, J = 7Hz) C-7-2H; 1,3-2,8 (br. m, 10-11 H insges.)

s.Abb. 18a u. 18b, S. 34 u. 35; Spektraldaten S.36, Tab.3 (in CDCl_3 , Raumtemperatur, CHCl_3 = 7,24 ppm int.St.)

s.Abb. 19 S.39: Temperaturstudie bei 25°, 80° u. 115°C (in DMSO-d_6 , 60 MHz, TMS int.)

$^{13}\text{C-NMR}$: a) (in CDCl_3 , 67,88 MHz, Raumtemperatur, CDCl_3 = 77,0 ppm)

b) (in DMSO-d_6 , 25,2 MHz, bei 50° und 130°C, TMS int.)

Spektraldaten s. Tabelle 4 S. 43 und Abb. 20 u. 21 S.41 u. 42

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)

M^+ 405 (25), 274 (100), 260 (22), 215 (14), 203 (11), 189 (11), 188 (14), 174 (11), 160 (34), 159 (26), 158 (13), 146 (50), 132 (23), 131 (100), 118 (13), 110 (16), 106 (14), 105 (14), 104 (33), 103 (54), 101 (18), 100 (25), 91 (23), 84 (21), 77 (26), 70 (32), 56 (14)

23.11 Hydrierung von Celacinnin (PA-II) zu Dihydrocelacinnin

(Dihydro-PA-II)

Ausgehend von 125 mg PA-II wurden nach 24 Stdn. mit der in 20.2 beschriebenen Methode 125 mg Hydrierungsprodukt erhalten, das bei der DC nur minimale Fluoreszenzminderung zeigte. Nach Umkristallisieren verblieben 68 mg reines Dihydrocelacinnin. Aus der Mutterlauge konnten durch präp. DC weitere 18 mg gewonnen werden.

Dihydrocelacinnin

$C_{25}H_{33}N_3O_2$ (407,56) Ber. C 73,67% H 8,16% N 10,31%
 Gef. C 74,23% H 7,63% N 10,21%

DC: Rf = 0,51 (EtOAc - BuOH-2 - Et₂NH = 80 : 15 : 5)
 Rf = 0,39 (EtOAc - BuOH-2 = 75 : 25)
 Rf = 0,30 (EtOAc - BuOH-2 = 85 : 15)

Smp: 176 - 178°C Lit. (42): 172 - 173°C

$[\alpha]_D^{24} = -16,0^{\circ}$ (c = 0,78; in CHCl₃)

UV: (MeOH) λ_{max} (ϵ): 253 (490), 258 (540), 264 (430),
 268 (350)

Lit. (42) : 253 (520), 260 (600), 265 (520), 269 (380)

IR: (KBr) ν (cm⁻¹) : 3350 (NH), 2970 u. 2920 (CH), 1630-1620
 (CO, Amid), 1550, 1480, 1440, 1430, 1180, 1110, 755,
 745, 695 (Ar.)

¹H-NMR: (60 MHz, CDCl₃, TMS int.)

δ = 7,5-7,8 ppm (1H) N-5-H; 7,15 -7,50(m, 10H), 2 Phenyl-
 reste; 3,97 (t, 1H, J ca. 7 Hz) C-8-H ; 1,2-4,0 (br.m, ca.
 22 H), davon bei 2,50 (d, J ca. 7 Hz).

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)

M⁺ 407 (25), 275 (11), 274 (47), 215 (11), 203 (14),
 189 (18), 176 (14), 163 (10), 160 (44), 159 (70), 158 (12),
 155 (15), 146 (70), 132 (16), 131 (22), 129 (15), 120 (14),
 118 (17), 112 (14), 110 (14), 106 (24), 105 (50), 104 (36),
 103 (15), 101 (14), 100 (27), 98 (26), 91 (100), 84 (30),
 77 (11), 72 (11), 70 (60), 58 (10), 57 (11), 56 (24),
 55 (12), 44 (29), 42 (11), 41 (13)

23.12 Acetyl-Celacinnin (PA-II-Acetat)

Ausgehend von 68 mg PA-II wurde nach der auf S.124 beschriebenen
 Methode acetyliert. Nach präp. DC im LM Äthylacetat-Butanol-2
 (75:25) wurden 31 mg PA-II-Acetat erhalten.

$C_{27}H_{33}N_3O_3$ (447,58) Ber. C 72,45% H 7,43% N 9,39%
Gef. C 72,50% H 7,28% N 9,46%

DC: Rf = 0,38 ($CHCl_3$ - BuOH-2 = 88 : 12)
Rf = 0,30 (EtOac - BuOH-2 = 75 : 25)
Rf = 0,23 (EtOac - BuOH-2 = 85 : 15)

Smp: amorph (115° - 118°C) Lit. (42) weißes amorphes Pulver
 $[\alpha]_D^{24} = +67,7^\circ$ (c = 0,939 in $CHCl_3$)

IR: (KBr) ν (cm⁻¹) : 3300 (NH) 2930 (CH) 1650 - 1580
(verbr. C = O, Amid nicht aufgelöst) 1410, 1350, 1190,
965 (trans-Olefin), 760, 700-690 (monosubst. Benzolring)
Lit. (42) : 6.00; 6.10; 6.18; 6.33 (μ m)

¹H-NMR: ($CDCl_3$, 60MHz, Raumtemperatur, TMS int.)
 δ = 7,80 ppm (d, 1H, J = 15,5 Hz) C - 7'-H; 7,1-7,7 ppm
(m, 1 OH); 6,88 ppm (verbr. d, 1H, J = 15,5 Hz) C-8'-H;
7,5-7,85 ppm (m, 1H) Amid N -5- H ; 5,6-5,9 (m, 1H)
C - 8 -H; 1,0-4,3 ppm (m, ca. 20-22 H) aliph. CH_2 -
Gruppen; 2,46 (s, 3H) N-9-Acetyl

(DMSO-d₆, 60 MHz, Raumtemperatur, TMS int.)
 δ = 8,1-8,4 (m, 1H) Amid N -5'-H; 7,15-7,85 ppm (m, 11H);
7,08 ppm (verbr. d, 1H, J = 15,5 Hz) C - 8' -H; 5,6 ppm
(verbr. "t", 1H, J ca. 7 Hz); 1,4-4,0 ppm (m, ca. 20 H),
davon: 2,98 (verbr. d, ca. 2 H, J ca. 7 Hz) C-7-2H ;
2,32 ppm (br. s, 3 H) N-9-Acetyl.

(DMSO-d₆, 60 MHz, 130°C, TMS int.)
 δ = 7,25-7,85 ppm (m, 11-12 H), davon bei 7,48 ppm
(d, J = 15,5 Hz) C - 7' -H; 6,95 ppm (d, 1H, J = 15,5 Hz)
C - 8' -H; 5,47 ppm (dd, 1H, J = 10/4,5 Hz) C - 8 -H;
1,5-3,8 ppm (m, ca. 20 H), davon 2,18 ppm (s, 3H)
N-9-Acetyl.

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)
 M^+ 447 (3), 404 (4), 356 (10), 316 (16), 205 (10),
188 (10), 169 (53), 157 (12), 143 (8), 132 (19),
131 (100), 112 (37), 103 (58), 77 (17), 70 (33).
Lit. (42): M^+ = 427,2476

23.13 Acetyl-Dihydrocelacinnin (Dihydro-PA-II/PA-III-Acetat)

$C_{27}H_{35}N_3O_3$ (449,60)

Smp.: amorph (im Bereich 70-75°C)

DC: Rf = 0,38 (EtOAc - BuOH-2 = 75 : 25)

$[\alpha]_D^{24} = +4,6^\circ$ (c = 0,526 in $CHCl_3$)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3300 (NH), 2940 (CH), 1650-1590 (br. C=O-Amidbande I), 1530, 1430, 1400, 1250, 1190, 1020, 795, 745, 695 (Ar.)

1H -NMR: ($CDCl_3$, 60 MHz, Raumtemperatur, TMS int.)
 δ = 7,0-7,5 ppm (m, ca. 10-11 H); 5,5-5,8 ppm (m, 1H) C-8-H; 1,2-4,3 ppm (m, ca. 22 H), aliph. Protonen, 2,45 ppm (s, 3 H) N-9-Acetyl;

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)
 M^+ 449 (14), 407 (17), 406 (55), 317 (12), 316 (54), 219 (10), 188 (12), 169 (47), 157 (19), 143 (10), 132 (10), 131 (41), 113 (13), 112 (60), 105 (54), 104 (37), 103 (26), 98 (15), 91 (100), 84 (20), 79 (10), 78 (10), 77 (17), 70 (62), 56 (23), 55 (14), 44 (32), 43 (47), 42 (18), 41 (24)

23.14 UV-Isomerisierung von Celacinnin (PA-II)

Vorversuch: Eine Lösung von ca. 50 mg Celacinnin in ca. 6-7 ml Äthanol wurde auf vier offene Rollrandgläschen (a, b, c, d) verteilt. Probe a) blieb unverändert. Probe b) wurde mit 2 Tropfen 2n-HCl, Probe c) mit 1 Tropfen CH_3COOH und Probe d) mit 4 Tropfen konz. Na_2CO_3 -Lösung versetzt. Alle vier Proben wurden in gleicher Weise mit langwelligem UV-Licht bestrahlt. DC in dem LM : EtOAc-BuOH = 85:15 und LM: EtOAc-EtOH = 87:13 zeigte, daß vor allem in der essigsäuren Probe c) neben PA-II noch ein weiterer Dragendorff-positiver Fleck nachweisbar war. Außerdem entstand auch ein hellblau fluoreszierendes Abbauprodukt, das bei der DC in der Startzone sitzen bleibt.

Hauptversuch: 75 mg Celacinnin (PA-II) wurden in ca. 10 ml Äthanol gelöst, mit einigen Tropfen CH_3COOH versetzt und einige Tage mit einer Quecksilberlampe (UV, 360 nm) bestrahlt. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte mit präp. DC im LM: EtOac-EtOH = 87:13. Es konnten 33 mg Celacinnin (PA-II) zurückgewonnen werden sowie 17 mg eines Produkts mit niederem Rf-Wert. Die spektroskopischen Untersuchungen bestätigten, daß es sich dabei um die cis-Cinnamoylverbindung handelte, die mit dem aus *Pleurostyliia africana* isoliertem Celallocinnin (PA-III) identisch war.

23.2 Celallocinnin (Mh 2 bzw. PA-III)

$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ (405,54) Ber. C 74,04% H 7,70% N 10,36%
Gef. C 74,21% H 7,12% N 10,30%

DC: Rf = 0,53 (EtOac - EtOH - H_2O = 95 : 5 : 5)
Rf = 0,39 (EtOac - EtOH = 90 : 10)
Rf = 0,26 (EtOac - BuOH-2 = 85 : 15)

$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -21,8^{\circ}$ (c = 0,8; CHCl_3)
Lit. (42): $\alpha_{\text{D}}^{25} = -24^{\circ}$ (c = 0,231 CHCl_3)

Smp.: $173^{\circ} - 175^{\circ}\text{C}$ Lit. (42): $172^{\circ} - 173^{\circ}$

UV: (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ ($\epsilon = 13400$)
Lit. (42): 255 nm ($\epsilon = 11800$)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3380 und 3320 (N-H), 2940 (CH-Val.), 1630 und 1600 (C=O, Amid) 1520, 1480, 1440, 1420 (Aromaten)
1190, 1110, 760 und 685 (monosubst. Benzolring)
Lit. (42): (CHCl_3) μm : 2,76; 2,90; 6,02; 6,20;

$^1\text{H-NMR}$: (60 MHz, CDCl_3 , Raumtemperatur, TMS int.)
s. Abb. 15 S. 31

$\delta = 7,1-7,7 \text{ ppm}$ (m, 10 - 11 H), 2 Phenylreste + Amid-NH, 6,67 ppm (d, 1H, J = 12,5 Hz), C-7'-H; 6,08 ppm (d, 1H, 12,5 Hz) C-8'-H; 3,97 ppm (br. t, 1H, J = 7 Hz) 3,0-3,8 ppm (br. m, ca. 6 H); 2,43 ppm (d, 2 H, J = 7 Hz) C-7-2H; 1,1 - 2,7 ppm (br. m, ca. 11 H)

(360 MHz, CDCl_3 , 22° , $\text{CHCl}_3 = 7,25$ ppm int.) s. Abb. 22 S. 44
 $\delta = 7,60$ ppm (m, $1/2$ H) Amidsignal N-5-H eines Konformeren; $7,2-7,4$ ppm (m, ca. 9 H); $7,15$ ppm (m, 2H) C-2",6"-H; $6,60$ u. $6,57$ ppm (2d, je $1/2$ H, $J = 12,5$ Hz) C-7'-H; $6,03$ und $6,06$ ppm (2d, je $1/2$ H, $J = 12,5$ Hz) C-8'-H; $3,88$ ppm (m, 1H) C-8-H; $2,88-3,82$ ppm (mehrere kompl. m, 6H) C-2, 4, 13 -2H; $2,26-2,68$ ppm (geglied. m, 4H) C-7-2H u. C-10-2H; $2,0-2,15$ ppm (m, 1H) C-3-H; $1,15-1,90$ ppm (gegliedertes m, ca. 6-7H) C-3-H', C-12-2H, C-11-2H

Bemerkbare Veränderungen bei 52°C :

Amid-NH ($1/2$ H) von $7,60$ auf $7,45$ ppm verschoben;

Multiplett von C-8-H bei $\delta = 3,88$ ppm wird zu Doppeldublett

(60 MHz, Temperaturstudie in $\text{DMSO}-d_6$, TMS int.) (s. Abb. 23 S. 45)

	25° ($\delta = \text{ppm}$)	90° ($\delta = \text{ppm}$)	130° ($\delta = \text{ppm}$)
N-5-H (Amid)	7,97 "m"	ca. 7,85 "m"	ca. 7,75 "m"
C-7'-H (β -H)	6,62 br.d ($J=12,5$ Hz)	6,62 d ($J= 12,5$ Hz)	6,62 d ($J=12,5$ Hz)
C-8'-H (α -H)	6,17 u. 6,20 je 1 d ($J = 12,5$ Hz)	6,14 br.d ($J = 12,5$ Hz)	6,15 d ($J=12,5$ Hz)
C-8-H	br.m, ca. 4 ppm	m (dd erkennbar) ca. 4 ppm	3,98 dd ($J=5,5/9,5$ Hz)

(360 MHz, Temperaturstudie im $\text{DMSO}-d_6$, $\text{DMSO} = 2,49$ ppm int.St.)

	25° ($\delta = \text{ppm}$)	90° ($\delta = \text{ppm}$)	130° ($\delta = \text{ppm}$)
N-5-H (Amid)	8,0 "m" (1H)	7,82 "d" (1H)	7,70 br. "s" (1H)
C-7'-H (β -H)	6,54 u. 6,56 d ($1/2$ H, $J= 12,5$ Hz)	6,54 u. 6,56 d ($1/2$ H, $J=12,5$ Hz)	6,55 d ($J=12,5$ Hz)
C-8'-H (α -H)	6,14 u. 6,18 d ($1/2$ H, $J=12,5$ Hz)	6,14 u. 6,18 d ($1/2$ H, $J=12,5$ Hz)	6,14 br.d ($J=12,5$ Hz)
C-8-H	3,9 (m, 1H)	3,9 m	3,93 dd (3,5/11,5 Hz)
C-7-H	2,33 br. "t" (J ca. 11 Hz)	2,33 br. "t" (J ca. 11 Hz)	2,37 dd (11,5/15 Hz)
C-7-H'	2,17 m	2,17 m	2,24 dd (3,5/15 Hz)

23.21 Hydrierung von PA-III (Celallocinnin) zu Dihydrocelacinnin

47 mg PA-III wurden 2 Tage nach der Methode auf S.124 hydriert. Nach Reinigung des Reaktionsproduktes mit präp. DC im Laufmittel Äthylacetat-Butanol-2 - Diäthylamin (80:15:5) und Umkristallisieren aus Äthylacetat/Diisopropyläther wurden 12 mg Dihydro-PA-III (Smp. 177-179°C) erhalten.

Die Identität mit dem aus PA-II hergestellten Dihydrocelacinnin (s. S.143) wurde durch den Mischschmelzpunkt (177-178°C), DC-Vergleich und Überlagerungs-IR (s. Abb. 17 S. 32) nachgewiesen.

23.3 Pleurostylin (PA-I)

$C_{25}H_{29}N_3O_2$ (403,52) Ber. C 74,41% H 7,24% N 10,41%
Gef. C 74,33% H 7,25% N 10,32%

DC: Rf = 0,55 (EtOAc - EtOH = 90:10)
Rf = 0,44 (CHCl₃ - BuOH-2 = 90 : 10)
Rf = 0,42 (EtOAc - BuOH-2 = 85 : 15)

Smp.: 246 - 247°C

$[\alpha]_D^{25} = -194^\circ$ (c = 0,896 in CHCl₃)

UV: (MeOH) $\lambda_{max} (\epsilon)$: 267 (11700)

IR: (KBr) ν (cm⁻¹): 3290 (NH); 3080 und 2920 (CH);
1640 und 1620 (CO, Amid) 1570; 1480; 1430; 1350;
1220; 1120; 1105; 815 (-CH=CH-CO-, cis-Olefin);
740 u. 695 (Ar.)

¹H-NMR: (DMSO-d₆, 60 MHz, Raumtemperatur, TMS int.)
 δ = 8,13 ppm (br.t, 1H, mit D₂O austauschbar)
Amid, N-5-H; 7,2-7,8 (m, 9H) mono- und disubst.
Phenylrest; 7,12 (d, 1H, J=12 Hz) C-7'-H;
6,17 (d, 1H, J = 12 Hz) C-8'-H; 4,72 (br.t, 1 H)
C-2-H; 3,8-4,2 (m, 1H) C-8-H; 1,1-3,8 (br. m, einschließ-
lich Signal von DMSO-d₆ und H₂O)
(DMSO-d₆, 360 MHz, Raumtemperatur, DMSO = 2,49
ppm 50 mg/0,4 ml; Spektrum 1) s. Abb. 28 S.59
Spektraldaten s. Tabelle 7 S. 58.

(CDCl₃: DMSO-d₆ = 5:1; 360 MHz, Raumtemperatur, CHCl₃ = 7,25 ppm; 5 mg/0,4 ml; Spektrum 2) s. Abb. 29 S. 61
Spektraldaten s. Tabelle 8 S. 60

¹³C-NMR: (DMSO-d₆; 67,88 MHz, Raumtemperatur, DMSO-d₆ = 39,5 ppm int. St.) Breitbandentkopplung, Off-Resonance-Entkopplung, Off-Resonance-Rauschentkopplung s. Abb. 27a und 27b S. 55

Spektraldaten s. Tabelle 6 S. 56

MS: (rel. Int. nach dem nieder aufgelösten MS, Angabe der atomaren Zusammensetzung der Fragmente im hochaufgelösten MS soweit innerhalb 0,009 Masseneinheiten zweifelsfrei möglich); m/e:

M⁺ = 403,226 (C₂₅H₂₉O₂N₃/76); 401,208 (C₂₅H₂₇O₂N₃/6); 334,168 (C₂₁H₂₂O₂N₂/10); 331,173 (C₂₃H₂₃ON₂/6); 305,169 (C₂₀H₂₁ON₂/5); 258,175 (C₁₆H₂₂ON₂/7); 257,164 (C₁₆H₂₁ON₂/5); 243,115 (C₁₄H₁₅O₂N₂/6); 230,141 (C₁₄H₁₈ON₂/9); 229,134 (C₁₄H₁₇NO₂/11); 228,134 (C₁₅H₁₈ON/10); 226,108 (C₁₄H₁₄ON₂/6); 225,103 (C₁₄H₁₃ON₂/8); 215,119 (C₁₃H₁₅ON₂/16); 214,123 (C₁₄H₁₆ON/26); 213,103 (C₁₃H₁₁O₂N) u. 213,078 (C₁₃H₁₁O₂N); 203,118 (C₁₂H₁₅ON₂/44); 200,104 (C₁₃H₁₄ON/18); 199,100 (C₁₃H₁₃ON/9); 198,091 (C₁₃H₁₂ON/9); 188,098 (C₁₁H₁₂ON₂/5); 187,087 (C₁₁H₁₁ON₂/7); 186,098 (26); 185,086 (C₁₂H₁₁ON/19); 184,077 (C₁₂H₁₀ON/15); 175,130; 175,092; 175,084 (zus. 14%); 174,093 (C₁₁H₁₂ON/18); 173,115; 173,082 (C₁₁H₁₁ON/zus. 17%); 172,113 (C₁₂H₁₄N/56); 171,109 (C₁₂H₁₃N); 171,067 (C₁₁H₉ON); 170,067 (30); 169,094 (11); 168,078 (?); 160,076 (C₁₀H₁₀NO/ca. 20); 160,111 (C₁₁H₁₄N/ca. 40); 159,103 (C₁₁H₁₃N/ca. 50) u. 159,066 (C₁₀H₉ON/ca. 15); 158,095 (C₁₁H₁₂N/25); 158,062 (C₁₀H₈ON/ca. 30); 157,087 (20); 157,064 (C₁₁H₉O/30); 156,081 (C₁₁H₁₀N/16); 147,066 (C₉H₉ON/12); 146,097 (C₁₀H₁₂N/ca. 25); 146,060 (C₉H₈ON/ca. 70); 145,088 (C₁₀H₁₁N/17); 144,080 (C₁₀H₁₀N/ca. 20); 144,057 (C₁₀H₈O/ca. 10); 143,079 (32); 142,074 (24); 141,072 (22); 132,081 (C₉H₁₀N/28); 131,085 (10); 131,073 (C₉H₉N/9) u. 131,049 (C₉H₇O/20); 130,065 (C₉H₈N/25); 129,068 (47); 128,060 (41); 127,054 (12); 120,081 (C₈H₁₀N/12); 119,073 (C₈H₉N/15); 118,067

(C₈H₈N/27); 117,070 u. 117,059 (zus.10); 116,062 (16);
 115,055 (47); 106,069 (C₇H₈N/35); 105,071 (C₈H₉);
 104,058 (C₈H₈/58); 103,056 (C₈H₇/15); 103,043 (C₇H₅N/14);
 102,048 (C₈H₆/11); 91,055 (C₇H₇/38); 79,054 (C₆H₇/10);
 78,044 (C₆H₆/16); 77,038 (C₆H₅/20); 76,031 (C₆H₄/8);
70,066 (C₄H₈N/100); 69,058 (C₄H₇N/10); 69,071 (C₅H₉/10)

23.31 Acetyl-Pleurostylin (PA-I-Acetat)

C₂₇H₃₅N₃O₃ (445,56) Ber. C 72,78% H 7,01% N 9,43%
 Gef. C 71,43% H 7,24% N 8,46%

DC: Rf = 0,49 (CHCl₃ - MeOH = 87 : 13)
 Rf = 0,18 (EtOac - BuOH-2 = 85 : 15)

Smp.: amorph

$[\alpha]_D^{22} = -164,8^{\circ}$ (c = 0,556 in MeOH)

UV: (MeOH) $\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11800$)

IR: (KBr) ν (cm⁻¹): 3330 u. 3070 (NH-asso.),
 2985 - 2940 (CH-Vol.), 1710 u. 1670 (Schulter),
 1630 u. 1590 (CO-Amid), 1560, 1500, 1440, 1410,
 1350, 1210, 1150, 930, 815, 750, 695 (Ar.)

¹H-NMR: (60 MHz, CDCl₃, TMS int.)
 $\delta = 8,3-8,6 \text{ ppm}$ (1H) Amid N-5-H; 7,2-7,5 ppm (9H)
 Phenylrest am C-8 und ortho-subst. Zimtsäure-
 phenyl; 7,03 ppm (verbr. d, 1H, J = 12 Hz) C-7'-H;
 6,26 ppm (d, 1H, J = 12 Hz) C-8'-H; 5,62 ppm
 (verbr. t, J = 7-8 Hz) C-8-H; 2,0-4,6 ppm (m, 14H)
 davon 2,23 ppm (s, 3H) Acetyl am N-9; 1,6-1,9 ppm
 (m, 4H) C-11-2H u. C-12-2H.

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)
 M⁺ 445 (15), 403 (23), 402 (100), 377 (23), 335
 (11), 334 (16), 333 (42), 272 (13), 271 (55), 245
 (11), 215 (11), 214 (10), 213 (10), 205 (12),
 200 (13), 188 (11), 186 (15), 185 (13), 184 (13),
 174 (18), 172 (25), 171 (14), 170 (36), 160 (17),

159 (12), 158 (39), 157 (28), 156 (11), 146 (11), 144 (28), 143 (23), 142 (15), 141 (13), 132 (18), 131 (91), 130 (23), 129 (30), 128 (22), 115 (29), 114 (24), 112 (80), 105 (14), 104 (27), 103 (36), 91 (20), 77 (14), 72 (13), 70 (75), 69 (16), 55 (18), 43 (25), 30 (34).

23.32 Dihydropleurostylin (Dihydro PA-I)

$C_{25}H_{31}N_3O_2$ (405,55) Ber. C 74,04% H 7,71% N 10,36%
Gef. C 74,37% H 7,69% N 10,31%

DC: Rf = 0,50 (EtOAc - EtOH = 90 : 10)
Rf = 0,34 (EtOAc - BuOH = 85 : 15)

Smp.: amorph (im Bereich 230°C)

$[\alpha]_D^{26} = +10,10^0$ (c = 0,543, in MeOH)

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 252 (460); 258 (490);
264 (420); 268 (310)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3300 u. 3060 (NH-asso.); 2920 (CH-Val); 1640 u. 1610 (CO - Amid); 1540; 1480; 1430; 1360; 1090; 750 u. 695 (Ar.)

1H -NMR: s. Abb. 26 S. 50 (60 MHz, DMSO- d_6 , TMS int.)
 δ = 8,20 ppm (br.t, 1H, J = 4-6 Hz, mit D_2O austauschbar) Amid N-5-H; 7,1-7,8 (9H, kompl.m) mono- u. disubst. Aromat; 4,52 ppm (br.t, 1H) C-2-H; 3,9-4,2 (1H) C-8'-H; 1,9-3,8 ppm (mind. 15 H); 1,2-1,8 ppm (m, 4H) C-11-2H u. C-12-2H

MS: m/e (mind. 10% rel. int.)
 M^+ 405 (19), 260 (2), 259 (2), 230 (11), 216 (11), 203 (12), 188 (17), 176 (16), 174 (16), 172 (19), 160 (43), 159 (56), 153 (19), 146 (59), 144 (14), 143 (17), 132 (21), 131 (27), 130 (19), 129 (21), 128 (11), 119 (16), 118 (24), 117 (50), 116 (21), 115 (21), 106 (18), 105 (21), 104 (39), 103 (19), 91 (37), 77 (16), 70 (100), 69 (21), 56 (11), 55 (21), 43 (11), 41 (12).

23.4 Cyclocelabenzin (Mm-I)

$C_{23}H_{27}N_3O_2$ (377,48) Ber. C 73,18% H 7,21% N 11,13%
Gef. C 73,12% H 7,16% N 10,81%

DC: Rf = 0,58 ($CHCl_3$ - MeOH = 90 : 10)
Rf = 0,66 (CH_2Cl_2 - MeOH = 92 : 8)
Rf = 0,39 (CH_2Cl_2 - Isopropanol = 92 : 8)

Smp.: amorph (180 - 183°C)

$[\alpha]_D^{25} = +30,2^\circ (c = 0,831, \text{ in } CHCl_3)$

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 263 (4500), 253 (5600)
Endabsorption ab 230 nm

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3340 (NH); 2980 u. 2850 (CH);
1650-1610 (CO, Amid-I); 1600; 1570; 1540 (Amid-II);
1490; 1470; 1445; 1420; 1350; 1280; 1145; 750 u.
695 (Ar.) s.Abb. 34 S.70

1H -NMR: ($CDCl_3$, 60 MHz, TMS int.)

δ = 9,4-9,6 ppm (1H, mit CF_3COOD austauschbar)
Amid N-5-H; 8,25 (m, 1H) C-6'-H; 7,0-7,6 (m, ca. 8H)
C-3', 4', 5'-H u. Phenyl am C-8; 1,3-4,6 (br. m,
mind. 17 H) ($CDCl_3$, 200 MHz, TMS int.)

($CDCl_3$, 200 MHz, TMS int.) s.Abb. 36 a u. b S.73 u. 75
Spektraldaten s.Tab. 9a u. 9b S.73 u. 74

^{13}C -NMR: ($CDCl_3$, 50,29 MHz, $CDCl_3$ = 77,0 ppm int. St.)

s. Abb. 38 u. 39 S. 77 u. 79 ; Spektraldaten s. Ta-
belle 10 S.80

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)

M^+ = 377 (66); 306 (10); 305 (36); 217 (10); 216 (14);
215 (21); 203 (13); 202 (41); 200 (18); 188 (14);
187 (16); 184 (10); 177 (25); 176 (100); 175 (10);
174 (11); 173 (11); 172 (15); 160 (48); 159 (36);
158 (15); 153 (13); 147 (15); 146 (92); 145 (16);
132 (21); 131 (31); 128 (19); 119 (18); 118 (18);
106 (25); 105 (15); 104 (35); 103 (26); 91 (36);
84 (13); 77 (19); 72 (10); 70 (49); 69 (64); 56 (10);
55 (21); 44 (11); 43 (13); 42 (17); 41 (14).

23.41 N-Acetylcyclocelabenzin (Mm-I-Acetat)

$C_{25}H_{29}N_3O_3$ (419,53) Ber. C 71,57% H 6,96% N 10,02%
Gef. C 70,91% H 7,04% N 9,83%

DC: Rf = 0,34 (Aceton - Toluol - EtOH - 25% NH_3 =
40 : 40 : 6 : 2)
Rf = 0,27 (EtOac - BuOH-2 = 80 : 20)

Smp.: amorph (ca. 260° - 265°)

$[\alpha]_D^{22} = +22,1^\circ$ (c = 0,362, in $CHCl_3$) errechneter Wert!
 $[\alpha]_{578}^{22} = +27,2^\circ$ (direkt gemessene Werte zum Vergleich)
 $[\alpha]_{546}^{22} = +80,2^\circ$

UV: (MeOH) Schalter bei λ_{max} 251 nm ($\epsilon = 6200$)
Endabsorption ab etwa 230 nm

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3410 und 3270 (NH , evtl. $+H_2O$ -Spuren)
3070 (NH -assoz.); 2920 (CH); 1670-1600 (breite CO -
Bande, Amid) 1570; 1550; 1450; 1430; 1400; 1350;
1290; 1250; 1220; 1200; 1160; 1130; 1030; 795; 770;
740; 695 (Ar.)

1H -NMR: (DMSO- d_6 , 60 MHz, TMS int.)

a) Raumtemperatur

$\delta = 8,3$ ppm (1H) Amid N-5-H; 8,0 (m, 1H) C-6'-H;
7,1-7,7 (m, 8H); 5,48 (br.t, J ca. 5-8 Hz) C-8-H;
0,8-4,6 (br. Multipllettberge + H_2O + DMSO- d_6), da-
von 2,05 ppm (s, 3H) Acetylrest am N-9

b) ca. 120°C (s. Abb.35 S.72)

$\delta = 7,8-8,1$ ppm (m, 2H) N-5-H und C-6'-H; 7,1-7,7
(m, 8H); 5,49 (dd, 1H, J=5/10Hz) C-8-H; 0,8-4,6 ppm
(strukturiertes Multipllettsystem), davon 2,05
(s, 3H) Acetylrest am N-9

MS: (normalerweise Fragmente mit mind. 5% rel.Int. nach
dem hochaufgelösten MS, Angabe der atomaren Zusam-
mensetzung der Fragmente soweit innerhalb 0,009
Masseneinheiten möglich) m/e :

$M^+ = 419,219$ ($C_{25}H_{29}O_3N_3/7$); 376,202 ($C_{23}H_{26}O_2N_3/100$)
345,162 ($C_{22}H_{21}O_2N_2/9$); 319,179 ($C_{21}H_{23}O_2N/4$); 309,160

($C_{19}H_{21}N_2O_2/12$); 305,167 ($C_{20}H_{21}O_1N_2/8$); 260,150 (18);
 259,144 ($C_{15}H_{19}O_2N_2/49$); 258,134 ($C_{15}H_{18}O_2N_2/6$); 257,129
 ($C_{15}H_{17}O_2N_2/15$); 231,147 ($C_{14}H_{19}O_1N_2/3$); 217,130
 ($C_{13}H_{17}O_2N_1/11$); 215,110 (8); 201,112 ($C_{13}H_{15}O_1N_1/9$);
 200,106 ($C_{13}H_{14}O_1N_1/35$); 189,106 ($C_{11}H_{13}O_1N_2/5$); 188,108
 ($C_{12}H_{14}O_1N/4$); 186,092 ($C_{12}H_{12}O_1N/7$); 174,087 ($C_{11}H_{12}O_1N/5$);
 172,072 ($C_{11}H_{10}O_1N/7$); 160,112 ($C_{10}H_{14}N/9$); 160,076
 ($C_{10}H_{10}O_1N/10$); 159,075 (12); 158,061 ($C_{10}H_8O_1N/11$);
 147,066 (7); 146,060 ($C_9H_8N/23$); 145,054 ($C_9H_7O_1N/12$);
 132,080 ($C_9H_{10}N/4$); 132,055 (8); 131,052 ($C_9H_7O/44$);
 130,063 ($C_9H_8N/5$); 128,051 ($C_9H_6N/15$); 118,058 (8);
 117,064 (5); 112,076 ($C_6H_{10}N/5$); 105,068 ($C_8H_9/4$);
 104,059 ($C_8H_8/12$); 103,054 ($C_8H_7/19$); 91,054 ($C_7H_7/11$);
 84,080 ($C_5H_{10}N/5$); 77,036 ($C_6H_5/8$); 72,081 ($C_4H_{10}N/5$);
 70,066 ($C_4H_8N/15$).

Fortsetzung niederaufgelöstes MS: 69 (13); 58 (25); 55
 (21); 44 (28); 43 (100)

23.5 Isocyclocelabenzin (Mm-II)

$C_{23}H_{27}N_3O_2$ (377,48) Ber. C 73,18% H 7,21% N 11,13%
 Gef. C 73,19% H 7,28% N 11,03%

DC: Rf = 0,47 ($CHCl_3$ -MeOH = 90:10)
 Rf = 0,53 (CH_2Cl_2 -MeOH = 92:8)
 Rf = 0,20 (CH_2Cl_2 -Isopropanol = 92:8)

Smp.: 227° - 228° (Nadeln aus EtOAc)

$[\alpha]_D^{25} = +138,9^\circ$ (c = 0,58, in $CHCl_3$)

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): Schulter 264 (4940), 253 (5860)
 Endabsorption ab 220 nm

IR: s. Abb. 40, S. 83; (KBr) ν (cm^{-1}): 3300 (NH); 2930
 u. 2810 (CH); 1610 (CO, Amid-I); 1575; 1540; 1520
 (Amid-II, trans-Lactam); 1465; 1450; 1410; 1360;
 1325; 1290; 1245; 1200; 1150; 1100; 1080; 940;
 780; 755, 710 u. 640 (mono- u. disubst. Phenyl-
 rest)

¹H-NMR: (CDCl₃, 60 MHz, TMS int.)

δ = 8,2 ppm (m, 1H) C-6'-H; 7,7-8,1 (1H, br. m) Amid N-5-H; 7,0-7,6 (m, 6H) C-3',4',5'-3H u. C-3'', 4'', 5''-3H; 6,6-6,9 (m, 2H) C-2'', 6''-2H; 3,7-4,2 (m, 6H) C-8-H, C-4-H, C-13-2H u. C-2-2H; 2,8-3,2 (m, 2H) C-4-H' u. C-12-H; 1,5-2,7 (m, 6-7H) C-10-2H, C-7-2H, C-3-2H; 1,2 (1H, mit D₂O austauschbar) N-9-H; (CDCl₃, 360 MHz, CHCl₃ = 7,26 ppm int.St.) s. Abb. 43, 44 u. 45, S. 88, 90 u. 91; Spektraldaten s.

Tabelle 11a und 11b S. 88 u. 92.

¹³C-NMR: (CDCl₃, 67,88 MHz; CDCl₃ = 77,0 ppm int.St.)

Breitbandentkopplung und frequenzabhängige Off-Resonance-Entkopplung für F₂ = 8300, 8600 und 11200 Hz, s. Abb. 46a und 46b, S. 95 u. 97; Spektraldaten s.

Tabelle 12 S. 99.

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)

M⁺ = 377 (33%), 350 (10), 349 (41), 348 (11), 305 (6), 287 (15), 286 (77), 244 (10), 229 (11), 204 (67); 203 (42), 200 (11), 187 (14), 186 (32), 174 (11), 173 (18), 172 (26), 160 (16), 159 (55), 158 (10), 147 (18), 146 (100), 145 (19), 133 (18), 132 (48), 131 (29), 130 (10), 128 (18), 120 (14), 119 (19), 118 (22), 117 (12), 115 (21), 106 (37), 105 (26), 104 (49), 103 (27), 91 (36), 77 (21), 56 (26).

Hochaufgelöst wurden folgende Signale:

377,211 = C₂₃H₂₇N₃O₂ (ber. 377,210); 349,184 = C₂₁H₂₃N₃O₂ (ber. 349,179) oder C₂₂H₂₅N₂O₂ (ber. 349,192); 186,166 = C₁₆H₂₀N₃O₂ (ber. 286,156); 204,139 = C₁₃H₁₈NO (ber. 204,139); 203,129 = C₁₃H₁₇NO (ber. 203,131); 186,092 = C₁₂H₁₂NO (ber. 186,092); 160,074 = C₁₀H₁₀NO (ber. 160,076); 159,066 = C₁₀H₉NO (ber. 159,068); 146,057 = C₉H₈NO (ber. 146,060); 132,082 = C₉H₁₀N (ber. 132,081).

23.51 N-Acetyl-Isocyclocelabenzin (Mm-II-Acetat)

$C_{25}H_{29}N_3O_3$ (419,53) Ber. C 71,57% H 6,96% N 10,02%
Gef. C 71,66% H 6,83% N 9,87%

DC: Rf = 0,08 (EtOac - BuOH-2 = 80:20)
Rf = 0,32 (Aceton-Toluol-EtOH-25% NH_3 =
40 : 40 : 6 : 2)

Smp.: amorph (im Bereich 255°C)
[α]_D²⁵ = + 221° (c = 0,356, $CHCl_3$)

UV: (MeOH) λ max nm(ϵ): 263 Schulter (4760), 254 Schulter (5620)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3390 (scharf, Amid-NH); 2940 (CH),
1660, 1640 (CO, Amid) 1590; 1570; 1515; 1485;
1470; 1445; 1420; 1405; 1320; 1300; 1260; 1190;
1150; 1090; 1030; 995; 945; 800; 775; 745; 720;
700 (Ar.) 630.

¹H-NMR: (in $CDCl_3$, 200 MHz, TMS int.) s. Abb. 41 S. 85.
 δ = 8,03 ppm (m, 1H) C-6'-H; 7,37 (m, 2H) C-4'-H
u. C-5'-H; 7,18 (m, 3H) C-3", 4", 5"-3H; 7,01
(m, 1H) C-3'-H; 6,7-6,9 (m, 3H) C-2", 6"-2H u.
Amid N-5-H; 5,38 (dd, 1H, J = 12/3Hz) C-8-H;
4,45 (br. t, 1H, J ca. 11-13 Hz); 4,06 (m, 1H);
3,85 (dd, 1H, J = 3,5/13 Hz) C-13-H; 3,66 (m, 1H),
3,10 (br. "d", 1H, J ca. 13 Hz) C-13-H'; 2,7-3,1
(m, 5H); 2,60 (dd, 1H, J = 17/3,5 Hz) C-7-H; 2,26
(s, 3H) N-9-Acetyl; 1,87 (dd, J = 17/12 Hz) C-7-H';
1,5-2,0 (m, ca. 5-6H).

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)
 M^+ = 419 (78), 377 (29), 376 (100); 337 (m^*); 309
(m^*); 229 (10); 204 (10); 203 (11); 188 (10);
187 (10); 186 (23); 174 (29); 173 (10); 172 (14);
160 (19); 159 (23); 146 (27); 145 (13); 132 (17);
131 (32); 128 (12); 118 (10); 105 (11); 104 (23);
103 (20); 91 (20); 77 (13); 56 (14); 43 (26).

23.6 Celabenzin (Mm-IIa)

$C_{23}H_{29}N_3O_2$ (349,50) Ber. C 72,82% H 7,65% N 11,08%
Gef. C 72,80% H 7,35% N 10,95%

DC: Rf = 0,60 (CH_2Cl_2 -MeOH = 92:8)
Rf = 0,30 (CH_2Cl_2 -Isopropanol = 92:8)

Smp.: amorph (265-268) Lit. (42): 154-156°C

$[\alpha]_D^{25} = \pm 0^0$ (c = 0,45, $CHCl_3$)

Lit. (42): $[\alpha]_D^{25} = \pm 0^0$ (c=0,14; $CHCl_3$)

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): Schulter 263 (960) u. 257 (1410)
Lit. (42): 258(1390); 264 (935); 268 (685)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}): 3280 (br, NH); 2910 (CH); 1610 (C=O, Amid-I), 1530 (Amid II); 1470; 1450; 1410; 1300; 1210; 1100; 1070; 750 u. 695 (monosubst. Benzol).
Lit. (42): ($CHCl_3$) ν (μm): 2,90; 3,00; 6,04; 6,48; 6,99; 7,60; 8,95.

1H -NMR: ($CDCl_3$, 200 MHz, TMS int.)
 δ = 7,85 ppm (m, 1H), Amid N-5-H; 7,2-7,5 (m, 10H) Phenylrest an C-8 und Benzoylrest; 3,95 (m, 1H) C-8-H; 2,8-3,9 (br.m, 6H) C-2-2H; C-4-2-H u. C-13-2H; 2,25-2,75 (m, 4H) C-10-2H u. C-7-2H; 1,2-2,2 (m, ca. 7H) C-3-2H, C-11-2H, C-12-2H u. N-9-H.

(DMSO- d_6 , 100 MHz, bei 80°C und 130°C) s. Abb. 49, S. 103

Lit. (41,42): Keine NMR-Daten!

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)

M^+ = 379 (6); 378 (5); 307 (2); 174 (25); 234 (1); 233 (4); 160 (15); 159 (17); 146 (25); 132 (10); 131 (9); 118 (9); 106 (15); 105 (100); 104 (18); 103 (10); 100 (10); 91 (15); 84 (13); 78 (12); 77 (55); 70 (25); 56 (14); 51 (12); 45 (15).

Lit. (42): 379 (24); 307 (4); 274 (57);
234 (4); 160 (25); 146 (25);
131 (12); 105 (100)

23.7 Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV)

$C_{23}H_{27}N_3O_3$ (393,49) ($M^+ = 393,204$ ber. 393,205)

DC: Rf = 0,32 ($CHCl_3$ - MeOH = 90:10)
Rf = 0,05 (CH_2Cl_2 = Isopropanol = 92:8)

Smp.: amorph (Erweichen bei 135°C)

$[\alpha]_D^{24} = +113,1^\circ$ (c = 0,603, $CHCl_3$)

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): Schulter 265 (4130) und
256 (4850), ab 230 nm End-
absorption

IR: s. Abb. 50 S. 104 (KBr) ν (cm⁻¹): 3320 (br; NH u.
OH mit H-Brücken); 2940 (CH); 1630 (br., CO, Amid
I); 1540 (Ar. oder Amid II); 1430; 1310; 1200;
1160; 1100 (verbr.); 1030; 760 und 700 (monosubst.
Benzol)

¹H-NMR: (in $CDCl_3$, 60 MHz, TMS int.) s. Abb. 56 S. 111
 δ = 8,1 ppm (m, 1H) C-6'-H; 7,7 (m, 1H mit D₂O
austauschbar) N-5-H (Amid); 7,3-7,7 (m, 3H) C-3'-H,
C-4'-H u. C-5'-H; 7,0-7,3 (m, 3H) C-3"-H, C-4"-H,
C-5"-H; 6,6-6,9 (m, 2H) C-2"-H u. C-6"-H; 3,4-4,1
(m, 6H) 1,2-3,2 (br.m, ca. 10-11 H)
(in $CDCl_3$, 400 MHz, $CDCl_3$ = 7,25 ppm int. St.)
s. Abb. 55 u. 56, S.110 u. 111 ; Spektraldaten s.
Tabelle 14a u. 14b S. 110 u. 112

¹³C-NMR: (in $CDCl_3$; 25,2 MHz; 55°C; TMS int.) s. Abb. 53,
S. 108; Spektraldaten s. Tabelle 13 S. 108.
(Verbreiterung einzelner Singale ist aufnahmebe-
dingt. Der Versuch bei 110°C in Bromoform zu mes-
sen, führte zur Zersetzung der Substanz).

MS: m/e (mind. 10% rel. Int.)
 $M^+ = 393$ (5), 376 (27), 375 (50), 366 (16), 365
(58), 348 (10), 321 (6), 302 (4), 242 (12), 220
(58), 219 (21), 216 (17), 203 (13), 202 (13), 200
(13), 199 (17), 188 (15), 186 (18), 175 (24), 174
(17), 173 (29), 172 (31), 161 (13), 160 (40), 159
(21), 158 (16), 147 (21), 146 (100), 133 (15),

132 (507, 131 (41), 130 (13), 120 (13), 119 (31), 118 (50), 117 (12), 106 (29), 105 (40), 104 (50), 103 (25), 100 (22), 91 (36), 78 (13), 77 (25), 56 (40), 43 (13), 42 (17)

Hochaufgelöst wurden folgende Signale:

393,204 = $C_{23}H_{27}N_3O_3$ (ber. 393,205); 375,193 = $C_{23}H_{25}N_3O_2$ (ber. 375,195); 365,172 = $C_{21}H_{23}N_3O_3$ (ber. 365,174);
160,077 = $C_{10}H_{10}NO$ (160,076); 146,057 = C_9H_8NO (ber. 146,061)
118,062 = C_9H_8N (ber. 118,066); 104,048 = C_7H_6N (ber. 104,050) oder C_8H_8 (ber. 104,062)

23.71 N-Acetyl-Hydroxy-Isocyclocelabenzin (Mm-IV-Acetat)

Ca. 30 mg Mm-IV, die aus dem ^{13}C -NMR unzersetzt zurückgewonnen werden konnten, ergaben bei der Acetylierung nach der auf S.123 beschriebenen Methode bereits nach 3-4 Minuten eine schwerlösliche Ausfällung. Der weiße, amorphe Niederschlag wurde abgenutscht, mit 50% MeOH und kaltem Wasser nachgewaschen und getrocknet. Die Zugabe von Eiswasser zum Filtrat ergab lediglich Trübung, keine Ausfällung von weiterem Mm-IV-Acetat.

$C_{25}H_{29}N_3O_4$ (435,53) ($M^+ = m/e$ 435)

DC: $R_f = 0,59$ ($CHCl_3$ -MeOH = 87:13)

Smp.: amorph (315-320°C)

IR: s. Abb. 51 S. 105; $(KBr)\nu(cm^{-1})$: 3340 (ist., NH u. OH) 2950 (CH); 1650, 1620 u. 1600 (Co, Amidbanden), 1595, 1580, 1500, 1470, 1430, 1400, 1390, 1350, 1270, 1260, 1220, 1190, 1150, 1085, 1020, 980, 950, 800, 770, 740 u. 700 (monosubst. Benzol)

1H -NMR: (in DMSO- d_6 , bei 140°C, 60 MHz, TMS int.)
s. Abb. 52 S. 107

$\delta = 8,0$ ppm (m, 1H) C-6'-H; 7,3-7,6 (m, ca. 3H), 7,0-7,3 (m, ca. 3H) 6,7-7,0 (m, 2-3 H); 5,5 (1H) C-8-H; 5,65 (d, 12,5 Hz) C-13-H; 3,17 (d, 12,5 Hz) C-13-H'; 2,12 (s, 3H) Acetyl an N-9, 1,5-2,2 (m, ca. 6-7 H). Alle übrigen Signale im Bereich 2,5-4,5 ppm (ca. 5-6H) sind von der Grundlinie nicht zu unterscheiden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) TH. LOESENER, "Celastraceae und Hippocrateaceae" in A. Engler und K. Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2. Auflage Vol. 20b, S. 87-198, Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig (1942)
- 2) E. PALMER und N. PITMAN, "Trees of Southern Africa" Vol. II, S. 1271, A.A. Balkema, Cape Town (1972)
- 3) N.K.B. ROBSON, "Celastraceae incl. Hippocrateaceae" in Flora Zambesiaca (A.W. Exell, A. Fernandes und H. Wild), S. 355, Crown Agents, London (1963-1966)
- 4) F. HAERDI, J. KERHARO und J.G. ADAM, "Afrikanische Heilpflanzen" S. 106, Acta Tropica Suppl. 8, Verlag für Recht und Gesellschaft, Basel (1964)
- 5) J.M. WATT und M.G. BREYER-BRANDWIJK, "The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa" S. 177, E.u.S. Livingstone, Edinburgh (1962)
- 6) J.O. KOKWARO, Medicinal Plants of East Africa S. 52, East African Literature Bureau, Nairobi (1976)
- 7) K. FLEMMING und B. GRAACK, Arzneimittelforschung 17, 1541 (1967)
- 8) K. FLEMMING, CHR. FLEMMING und B. GRAACK, Strahlentherapie 133, 280 (1967)
- 9) A. PEREIRA jr. und L. GODINHO, Rev. Port. Farm 13, 1 (1963) (durch Chem. Abstr. 59:13115, 1963)
- 10) M. TIN-WA, N.R. FARNSWORTH, N.H.S. FONG, R.N. BLOMSTER, J. TROJANEK, D. ABRAHAM, G.J. PERSINOS und O.B. DOSKOSI, Lloydia 34, 79 (1971)
- 11) D.J. ABRAHAM, J. TROJANEK, H.P. MÜNZING, H.H.S. FONG und N.R. FARNSWORTH, J. Pharm. Sci., 60, 1085 (1971)
- 12) N. TIN-WA, Diss. Abstr. Int. B. 31(4)2092 (1970)
- 13) R. BRÜNING und H. WAGNER, Übersicht über die Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie; Phytochemistry 17, 1821 (1978)
- 14) R. HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen Bd. III S. 395 (1964), Birkhäuser Verlag, Basel
- 15) Persönliche Mitteilung von Dr. Mathew Suffness; Natural Products Branch, DR+DP, Division of Cancer Treatment, NCI National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20014, USA
- 16) S.M. KUPCHAN, Z. KOMODA, W.A. COURT, G.J. THOMAS, R.M. SMITH, A. KARIM, C.J. GILMORE, C. HALTWANGER und R.F. BRYAN, J. Am. Chem. Soc. 94, 1354 (1972)
- 17) S.M. KUPCHAN, Z. KOMODA, G.J. THOMAS, H.P.J. HINTZ, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1065 (1972)
- 18) S.M. KUPCHAN, Offenlegungsschrift des Dt. Patentamtes 2241 418 int. Code in Chem. Abstr. 71, 149094t. U.S. Patent 3,896.111 (1975) Int. Cl. C07d99/02

- 19) S.M. KUPCHAN, Y. KOMODA, A.R. BRANFTMAN, R.G. DAILEY und V.A. ZIMMERLY, J. Am. Chem. Soc. 96, 3706 (1974)
- 20) S.M. KUPCHAN, A.R. BRANFTMAN, A.T. SNEDEN, A.K. VERMA, R.G. DAILEY jr., Y. KOMODA und Z. NAGAO, J. Am. Chem. Soc., 97, 5294 (1975)
- 21) S.M. KUPCHAN, Y. KOMODA, A.R. BRANFTMAN, A.T. SNEDEN, W.A. COURT, G.J. THOMAS, H.P.J. HINTZ, R.M. SMITH, A. KARIM, G.A. HOWIE, A.K. VERMA, Y. NAGAO, R.G. DAILEY jr., V.A. ZIMMERLY und W.C. SUMNER jr., J. Org. Chem. 42, 2349 (1977)
- 22) M.C. WANI, H.L. TAYLOR und M.E. WALL, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 390 (1973)
- 23) E. HIGASHIDE, H. ASAI, K. COFSU, S. TANIDA, Y. KOZAI, T. HASEGAWA, T. KISHI, J. SUGINO und M. JONEDA, Nature 270, 721 (1977)
- 24) St. REMILLARD, L.I. REBHUN, G.A. HOWIE und S.M. KUPCHAN, Science 189, 1002 (1975)
- 25) S.M. SIEBER, M.K. WOLPERT, R.H. ADAMSON, R.L. CYSYK, V.H. BONO und D.G. JOHNS, Comparative Leukemia Research 1975, Bibl. Haemat. 43, 495 (Karger, Basel 1976)
- 26) M.K. WOLPERT-DEFILIPPES, R.H. ADAMSON, R.L. CYSYK und D.G. JOHNS, Biochem. Pharmacol. 24, 751 (1975)
- 27) R.T. EAGAN, E.T. CREAGAN, J.N. INGLE, S. FRYTAK und J. RUBIN, Cancer Treat. Rep., 62, 1577 (1978)
- 28) E.J. COREY, L.O. WEIGEL, D. FLOYD und M.G. BOCK, J. Am. Chem. Soc. 100, 2916 (1978)
- 29) E. RÖMHILD, Dissertation, München S. 85 (Nov. 1976)
- 30) R.M. SMITH, "The Celastraceae Alkaloids" in "The Alkaloids" (R.H.F. Manske ed.) Vol. XVI, 215, Academic Press, New York, 1976
- 31) K. YAMADA, K. SUGIURA, Y. SHIZURI, H. WADA und Y. HIRATA, Tetrahedron 33, 1725 (1977)
- 32) R.L. BAXTER, L. CROMBIE, D.J. SIMMONDS und D.M. WHITING, J.C.S., Chem. Comm., 463 und 465 (1976)
- 33) S.M. KUPCHAN u. R.M. SMITH, J. Org. Chem. 42, 115 (1977)
- 34) H. WAGNER, R. BRÜNING, H. LOTTER u. A. JONES, Tetrahedron Letters, 125 (1977)
- 35) C.C.J. CULVENOR, S.R. JOHNS, J.A. LAMBERTON und L.W. SMITH Australian J. Chem. 23, 1279 (1970)
- 36) D.W. BISHAY, Z. KOWALEWSKI und J.D. PHILLIPSON, Phytochemistry 12, 693 (1973)
- 37) A. PEREIRA und L.S. GODINHO, Rev. Port. Farm. 13, 1 (1963)
- 38) A. ULUBELEN und J. COLE, J. Pharm. Sci. 54, 1763 (1965)
- 39) G. RÜCKER, H. KRÖGER, M. SCHIKARSKI und S. QEDAN, Planta med. 24, 61 (1973)
- 40) G. ENGLER, K. KLINGA, E. RAYMOND-HAMET, E. SCHLITTLER und W. VETTER, Helv. Chim. Acta 56, 474 (1973)

- 41) S.M. KUPCHAN, H.P.J. HINTZ, R.M. SMITH, A. KARIM, M.W. CASS, W.A. COURT und M. YATAGAI, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 329 (1974)
- 42) S.M. KUPCHAN, H.P.J. HINTZ, R.M. SMITH, A. KARIM, M.W. CASS, W.A. COURT und M. YATAGAI, J. Org. Chem. 42, 3660 (1977)
- 43) R.F. HOCQUEMILLER, A. CAVÉ und H.P. HUSSON, Tetrahedron 33, 645 (1977)
- 44) H.H. BERNARDI und M. WASICKY, Ref. Sci. Pharm. 28, 121 (1960) Tribuna Farm. 31, 38 (1963)
- 45) N.R. FARNSWORTH, J. Pharm. Sci., 55, 225 (1966)
- 46) N.R. FARNSWORTH und R. MARTELLO, Lloydia 25, 176 (1962)
- 47) R. MUNIER und M. MACHEBOEUFF, Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 846 (1951)
- 48) R. MUNIER, Bull. Soc. Chim. France, 19, 852 (1952)
- 49) E. GRAF und H. FAUSS, Arch. Pharm., 310, 171 (1977)
- 50) N.R. FARNSWORTH, N.A. PILEWSKI und F.J. DRAUS, Lloydia, 25, 312 (1962)
- 51) L.A. ANDERSON, N.S. DOGGETT und M.S.F. ROSS, Planta med., 32, 125 (1977)
- 52) Persönliche Mitteilung von Prof. J.L. BEAL, Ohio State University, Columbus, USA
- 53) P.J. STEVENS, J. Chromatog. 14, 269 (1964)
- 54) C.H. BRIESKORN und H. HERRIG, Arch. Pharm. 292, 485 (1959)
- 55) G. SNATZKE, Chem. Ber. 94, 729 (1961)
- 56) B. BOITEAU, B. PASICH und A.R. RATSIMAMANGA, "Les Triterpenoides en physiologie vegetale et animale", Gauthier-Villars, Paris (1964)
- 57) M. SCHIKORSKI, Dissertation, Universität Münster (1976)
- 58) R.E. IRELAND u. D.M. WALBA, Tetrahedron Letters, 1071 (1976)
- 59) M. LAING, M.E. BURKE-LAING, R. BARTHO und C.M. WEEKS, Tetrahedron Letters, 3839 (1977)
- 60) V. PLOUVIER, Compt. Rend. 227, 85 (1948); 228, 1886 (1949); 242, 1645 (1956)
- 61) A. PUECH, M. JACOB und D. GAUDY, J. Chromatog., 68, 161 (1972)
- 62) D. VAGUYFALVI, Planta med., 13, 79 (1965)
- 63) J.T. EDWARD und S.C.R. MEACOCK, Chem. and Ind., 536 (1955)
- 64) NMR-Spectra Catalog, Vol. 1, No. 230, Varian Associates, Palo Alto, California (1962)
- 65) H.A. LLOYD, Tetrahedron Letters, 4537 (1965)
- 66) H.O. BERNHARD, J. KOMPIS, S. JOHNE, D. GRÖGER, M. HESSE und H. SCHMID, Helv. Chim. Acta, 56, 1266 (1973)
- 67) M. HESSE und H.O. BERNHARD in "Fortschritte der Massenspektrometrie, Vol. 3, Alkaloide S. 311-334 (1975) Ed. H. Budzikiewicz (Verlag Chemie, Weinheim)

- 68) H. BOSSHARDT, H.J. VEITH u. M. HESSE, Org. Mass Spectrom., 6, 325 (1972)
- 69) A. GUGGISBERG, R.W. GRAY und M. HESSE, Helv. Chim. Acta, 60, 112 (1977)
- 70) E. LERCH u. M. HESSE, Helv. Chim. Acta 55, 1883 (1972)
- 71) R. HOCQUEMILLER, M. LEBOEUF, B.C. DAS, H.P. HUSSON, P. POTIER und A. CAVE, C.R. Acad. Sc. Paris, 278, 525 (1974)
- 72) M. HESSE und H. SCHMID, MTP International Review of Science, Org. Chem. Ser. 2, S. 265-305, Butterworths, London - Boston (1976)
- 73) T.A. SMITH, Phytochemistry 14, 865 (1975)
- 74) R. HOCQUEMILLER, A. CAVE u. H.P. HUSSON, Tetrahedron 33, 653 (1977)
- 75) G. KAHNT, Phytochemistry, 6, 755 (1967)
- 76) W.D. PHILIPPS, J. Chem. Physics, 23, 1363 (1955)
- 77) L. PAULING, "Die Natur der chemischen Bindung", 3. Aufl. S. 267, Verlag Chemie, Weinheim BRD (1968)
- 78) H. KESSLER, Angew. Chemie, 82, 237 (1970)
- 79) H. KESSLER u. A. RIEKER, Liebigs Ann. Chemie, 708, 57 (1967)
- 80) R. HUISGEN u. H. WALZ, Chem. Ber., 89, 2116 (1956)
- 81) R. HUISGEN, H. BRADE, H. WALZ und J. GLOGGER, Chem. Ber. 90, 1437 (1957)
- 82) K.L. WILLIAMSON u. J.D. ROBERTS, J. Am. Chem. Soc. 98, 5082 (1976)
- 83) G.C. LEVY und G.L. NELSON, J. Am. Chem. Soc., 94, 4897 (1972)
- 84) A.E. GILLAM u. E.S. STERN, "Electronic Absorption Spectroscopy", Second Edition, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London (1957).
- 85) E. PRETSCH, T. CLERK, J. SEIBL u. W. SIMON, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1976)
- 86) K. RANDERATH, Dünnschicht-Chromatographie, S. 205, 2. Auflage 1965, Verlag Chemie, Weinheim (BRD)
- 87) E. BREITMAIER u. G. BAUER, ¹³C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1977)
- 88) E. WENKERT, A.O. CLOUSE, D.W. COCHRAN u. D. DODDRELL, J. Am. Chem. Soc. 91, 6879 (1969)
- 89) J.H. SADLER, Chem. Commun. 809 (1973)
- 90) K. ROTH, Org. Magn. Res., 10, 56 (1977)
- 91) J. DALE, Chemie und Konformationsanalyse, Verlag Chemie Weinheim - New York (1978)
- 92) H.A. LLOYD, Tetrahedron Letters, 1761 (1965)
- 93) W.M. BRIGHT, H.A. LLOYD u. J.V. SILVERTON, J. Org. Chem., 41, 2454 (1976)

- 94) G. FITTEL, Dissertation, Universität München (Januar 1979)
- 95) C.J. POUCHERT u. J.R. CAMPBELL, The Aldrich Library of NMR-Spectra, Vol. 6 und Vol. 7, Ed. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A. (1974)
- 96) E.W. HAGAMAN, Org. Magn. Res., 8, 389 (1976)
- 97) F. BOHLMANN u. D. SCHUMANN, Tetrahedron Letters, 2435 (1965)
- 98) H. GÜNTHER, NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973)
- 99) L.M. JACKMAN u. S. STERNHELL, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd ed., (1969) Pergamon Press, Oxford
- 100) C. POUPAT, H.P. HUSSON, B.C. DAS, P. BLADON u. P. POTIER, Tetrahedron 28, 3103 (1972)
- 101) B. BIRDSALL, N.J.H. BIRDSALL und J. FEENEY, Chem. Commun. 316 (1972)
- 102) R.A. NEWMARK u. J.R. HILL, J. Am. Chem. Soc., 95, 4435 (1977)
- 103) J. TRAVELL, J. Pharm. Sci., 33, 689 (1934)
- 104) F.F. MAYER, Am. J. Pharm., 3, 20 (1863) aus: R. MARTELLO u. N.R. FARNSWORTH, Lloydia, 25, 176 (1962)
- 105) R. TSCHESCHE, J. Chromatog., 5, 271 (1961)
- 106) R. IKAN, J. KASHMAN u. E.D. BERGMAN, J. Chromatog., 14, 275 (1964)
- 107) R.J. BLOCK, E.L. DURRUM u. G. ZWEIG, A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2nd ed. (1958) S. 180, Academic Press Inc. Publishers - New York
- 108) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage (1967) S. 819, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München angefertigt.

Für die Hilfe, die mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil wurde, möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. WAGNER für die Anregung zu dieser Arbeit und deren großzügige Förderung.

Herrn Dr. O. SELIGMANN und seinen Mitarbeiterinnen für die chemisch-physikalischen Untersuchungen, die an diesem Institut durchgeführt werden konnten.

Herrn Dr. A. NESZMELYI, Central Research Institute for Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Ungarn, Herrn Dr. B. WRACKMEYER, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, sowie den Herren Dr. V. FORMACEK und Dr. W.E. HULL für ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn U. SEIDEL, Institut für Organische Chemie der Universität München, und Prof. Dr. W. HERZ, Florida State University, Tallahassee, USA, für hochaufgelöste Massenspektren.

Frau Dr. S. BLADT, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre und Herrn T. MÜLLER, Salisbury, Rhodesien, für das Sammeln und Bestimmen des Pflanzenmaterials.

Frau M. SEITZ und Herrn Dr. G. TITTEL für ihre Hilfe bei den Alkaloidisolierungen aus *Maytenus mossambicensis*, sowie den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen, die mir in verschiedener Weise behilflich waren und die Arbeit und das Leben am Institut erleichtert haben.

L E B E N S L A U F

Joseph Burghart geboren am 12.10.1948 in Dachau/Bayern

Eltern: Joseph und Anna Burghart geb. Mannhardt, Landwirtsehepaar

Wohnort: Dachau, Schleißheimer Str. 55

Schulbildung: 1954 - 1959 Volksschule Dachau
1959 - 1968 Mathemat.-Naturwissen-
schaftl. Gymnasium in Dachau

Berufsausbildung:

Praktikantenzeit: 1968 - 1970 Sonnenapotheke Dachau

Pharm. Vorprüfung: 8.9.1970 in München

Studium der Pharmazie: WS 1970 - SS 1973 an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Pharm. Staatsprüfung 29.10.1973

Approbation als Apotheker: 7.12.1973

Wehrdienst: Februar 1974 - April 1975, Grundwehr-
dienst als Stabsapotheker an der
Sanitätsakademie der Bundeswehr,
München

Wissenschaftliche
Tätigkeit: Ab 1. Juni 1975 Wissenschaftliche
Hilfskraft am Institut für Pharma-
zeutische Arzneimittellehre der Uni-
versität München. Promotionsarbeit
unter Leitung von Herrn Prof. Dr.
H. Wagner. Seit 1. November 1978
Verw. d. Dienstgeschäfte eines wis-
senschaftlichen Assistenten.

